

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE BACTERIOCINAS SOBRE EL ENQUISTAMIENTO  
DE *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS Y CARACTERÍSTICAS NANOMECAÑICAS  
DE LA SUPERFICIE CELULAR AL MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA**

**Por:**

**FABIOLA LIZETH CUELLAR GUEVARA**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**Octubre, 2015**

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE BACTERIOCINAS SOBRE EL ENQUISTAMIENTO  
DE *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS Y CARACTERÍSTICAS NANOMECÁNICAS  
DE LA SUPERFICIE CELULAR AL MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA**

**Comité de Tesis**

---

**Dra. María Porfiria Barrón González**  
Presidente

---

**Dra. Zinnia Judith Molina Garza**  
Secretario

---

**Dra. María Eufemia Morales Rubio**  
Vocal

---

**Dra. Ruth Amelia Garza Padrón**  
Vocal

---

**Dr. Ramón Gerardo Rodríguez Garza**  
Vocal

Octubre, 2015

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE BACTERIOCINAS SOBRE EL ENQUISTAMIENTO  
DE *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS Y CARACTERÍSTICAS NANOMECÁNICAS  
DE LA SUPERFICIE CELULAR AL MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA**

**Dirección de Tesis**

---

**Dra. María Porfiria Barrón González**  
Director

---

**Dr. Jorge Luis Menchaca Arredondo**  
Director externo

## AGRADECIMIENTOS

*"La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste."*  
(Marie Curie)

Primeramente agradezco a Dios por sobre todas las cosas, por darme la vida y las fuerzas para lograr terminar este sueño que se hizo realidad.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Ciencias Biológicas por estos años en que me han abierto las puertas de sus instalaciones para el desarrollo de esta tesis y de mi desarrollo profesional.

A mis padres, Norma E. Guevara Salazar y Mauro Cuellar Aguirre, quienes a lo largo de mi vida tanto personal como profesional siempre han estado a mi lado apoyándome.

Agradezco en especial a Ricardo Pérez Rodríguez, doy gracias a Dios por tenerte en mi vida. Muchas gracias por tu inmensa paciencia, tu ayuda y apoyo siempre. Por estar allí conmigo en la realización de este proyecto.

Mi agradecimiento a la Dra. María Porfiria Barrón González gracias por abrirme las puertas del laboratorio; por su amistad, ayuda, consejos, paciencia y generosidad. Por todo lo que me ha enseñado e inspirado cada día, le estoy doblemente agradecida.

Agradezco al Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta por permitirme trabajar en su laboratorio. Por brindarme tan valiosa amistad, su asesoría y consejos.

Un agradecimiento especial al Dr. Jorge Luis Menchaca Arredondo, por haber aceptado fungir como mi director externo y brindarme su ayuda y apoyo en este proyecto.

A todos mis maestros del Departamento de Biología Celular y Genética, UANL.

Agradezco a todos mis buenos amigos y compañeros del laboratorio y compañeros de la carrera por permitirme aprender junto a ustedes, con mucho cariño.

Un agradecimiento muy especial a la M.C. Dinora J. Pérez Terrazas por su apreciable ayuda incondicional y aportaciones a este trabajo.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca proporcionada durante el desarrollo de este trabajo.

## DEDICATORIAS

*Mis logros los dedico a las personas que creen en mí...*

A mi hermosa familia, mi pilar y motor de todo mi esfuerzo realizado. Por enseñarme que el éxito no es el resultado de la casualidad sino del esfuerzo perseverante e incansable. Mis amados padres, Norma y Mauro, por estar al pie del cañón en todo momento; por levantarme cuando me sentí caída y que ya no podía y alentarme a dar un esfuerzo más. A mis queridos hermanos, Diana y Jesús. Es tanto mi agradecimiento hacia ustedes que una hoja no basta. Gracias porque siempre me dieron y me siguen dando su apoyo y amor incondicional y por estar conmigo en las buenas y en las malas. Gracias porque siempre creyeron en mí y no los defraudé. Familia, ¡Por fin terminé!

A mi querido Ricky, a quien agradezco inmensamente por estar siempre a mi lado en todo momento y en cada paso que dí. Por apoyarme en mis decisiones y tenerme paciencia en todo este camino. Te dedico este trabajo con mucho amor porque gracias a ti la carga fue un poco más ligera y porque siempre has creído en mí y en mis sueños.

A todos los que me acompañaron en algún momento de mi vida dentro de la Universidad: a mis apreciables maestros, compañeros y amigos. Son tantos sus nombres y bellos recuerdos que una sola hoja no me basta.

Nadie dijo que sería fácil, pero sí que valdría la pena.

*Saber que se puede, querer que se pueda  
quitarse los miedos sacarlos afuera  
pintarse la cara color esperanza  
tentar al futuro con el corazón.*

*Es mejor perderse que nunca embarcar  
mejor tentarse a dejar de intentar  
aunque ya ves que no es tan fácil empezar.*

*Sé que lo imposible se puede lograr  
que la tristeza algún día se irá  
y así será la vida cambia y cambiará.*

*Sentirás que el alma vuela  
por cantar una vez más,  
Vale más poder brillar  
que solo buscar ver el sol...*

# ÍNDICE

Sección	Página
Agradecimientos-----	iv
Dedicatorias-----	v
Índice de tablas-----	ix
Índice de figuras-----	x
Lista de símbolos y abreviaturas-----	xiv
Resumen-----	xv
Abstract -----	xvi
1. Introducción-----	1
2. Antecedentes-----	3
2.1 <i>Entamoeba histolytica</i> -----	3
2.1.1 Generalidades e historia-----	3
2.1.2 Clasificación taxonómica-----	5
2.1.3 Epidemiología-----	6
2.1.4 Ciclo de vida-----	7
2.1.5 Patogénesis-----	10
2.1.6 Sintomatología-----	11
2.1.7 Tratamiento-----	13
2.2 Probióticos-----	14
2.2.1 Importancia de los probióticos-----	16
2.2.2 Mecanismos de acción de los probióticos-----	17
2.3 Bacteriocinas-----	20
2.4 Microscopías-----	26
2.4.1 Microscopio Óptico (MO) -----	26
2.4.2 Microscopio de Fluorescencia (MF) -----	26
2.4.3 Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) -----	27
2.4.4 Microscopio de Fuerza Atómica (MFA) -----	28
2.4.4.1 Principales modos de operación del MFA-----	29
3. Justificación-----	32
4. Hipótesis-----	33
5. Objetivos-----	34
5.1 Objetivo general-----	34
5.2 Objetivos particulares-----	34
6. Diseño experimental-----	35
7. Material y métodos-----	36
7.1 Material biológico-----	36
7.2 Preparación de soluciones-----	37
7.3 Preparación del medio de cultivo-----	38
7.4 Metodología-----	38
7.4.1 <i>Entamoeba histolytica</i> -----	38
7.4.1.1 Mantenimiento-----	38

Sección	Página
7.4.1.2 Cinética de crecimiento bajo condiciones axénicas <i>in vitro</i> -----	38
7.4.1.3 Cinética de enquistamiento bajo condiciones axénicas <i>in vitro</i> -----	39
7.4.2 Probióticos-----	39
7.4.2.1 Mantenimiento-----	39
7.4.2.2 Cinética de crecimiento por método de turbidimetría-----	39
7.4.2.3 Obtención de factores extracelulares de probióticos (FEP) -----	40
7.4.3 Bioensayo de FEP sobre <i>E. histolytica</i> bajo condiciones axénicas <i>in vitro</i> -----	40
7.4.3.1 Evaluación de FEP sobre el crecimiento y enquistamiento de <i>E. histolytica</i> -----	40
7.4.3.2 Obtención de muestra de trofozoítos y ESQ en presencia de FEP para análisis a microscopía----	41
7.4.4 Obtención de proteínas a partir de FEP-----	42
7.4.4.1 Determinación cualitativa de proteínas mediante Prueba de Biuret-----	42
7.4.4.2 Obtención de bacteriocinas por precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -----	42
7.4.4.3 Caracterización de bacteriocinas por la técnica de electroforesis-----	43
7.4.5 Bioensayo de bacteriocinas sobre <i>E. histolytica</i> -----	45
7.4.5.1 Evaluación de bacteriocinas sobre crecimiento y enquistamiento de <i>E. histolytica</i> -----	45
7.4.5.2 Obtención de muestra de trofozoítos y ESQ en presencia de bacteriocinas para análisis a microscopía-----	45
7.4.6 Obtención de muestra de trofozoítos fijados a diferentes concentraciones de glutaraldehído-----	47
7.4.7 Análisis estadístico-----	47
8. Resultados-----	48
8.1 <i>Entamoeba histolytica</i> -----	48
8.1.1 Cinética de crecimiento-----	48
8.1.2 Cinética de enquistamiento-----	49
8.2 Probióticos: <i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. plantarum</i> y <i>Bifidobacterium longum</i> -----	50
8.2.1 Cinética de crecimiento-----	50
8.3 Bioensayos de Factores Extracelulares de Probióticos (FEP) sobre <i>E. histolytica</i> -----	51
8.3.1 Actividad biológica de FEP sobre trofozoítos y ESQ de <i>E. histolytica</i> -----	51
8.4 Bacteriocinas-----	53
8.4.1 Determinación cualitativa de proteínas -----	53

Sección	Página
8.4.2 Cuantificación de proteínas según normativa-----	53
8.4.3 Caracterización parcial de bacteriocinas de probióticos-----	54
8.5 Bioensayo de bacteriocinas sobre <i>E. histolytica</i> -----	56
8.5.1 Actividad biológica de bacteriocinas sobre trofozoítos y ESQ de <i>E. histolytica</i> -----	56
8.6 Microscopía-----	59
8.6.1 Microscopio Óptico (MO) -----	59
8.6.2 Microscopio de Fluorescencia (MF) -----	61
8.6.2.1 Observación de ESQ de <i>E. histolytica</i> cultivadas en presencia de FEP y bacteriocinas-----	61
8.6.3 Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) -----	62
8.6.3.1 Análisis morfológico de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> -----	62
8.6.3.2 Análisis morfológico de ESQ de <i>E. histolytica</i> ----	65
8.6.4 Microscopio de Fuerza Atómica (MFA) -----	67
8.6.4.1 Evaluación y actividad biológica de FEP y bacteriocinas sobre trofozoítos y su análisis morfológico-----	67
8.6.4.2Evaluación y actividad biológica de FEP y bacteriocinas sobre ESQ y su análisis morfológico-----	77
9. Discusión-----	86
10. Conclusiones-----	94
11. Perspectivas-----	95
12. Bibliografía-----	96
13. Resumen biográfico-----	107
14. Apéndice técnico-----	108
14.1 Anexo I. Análisis estadístico -----	108
14.2 Anexo II. Imágenes de indentación -----	113
14.3 Anexo III. Tabla comparativa de profundidad de indentación y material desplazado -----	114



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
I.	Incidencia de amebiasis en México-----	7
II.	Características de la microbiota del tracto gastrointestinal-----	15
III.	Clasificación de bacteriocinas de bacterias Gram positivas-----	22
IV.	Preparación de reactivos empleados para el estudio de <i>E. histolytica</i> -----	37
V.	Lista de muestras de bacteriocinas analizadas por electroforesis---	44
VI.	Distribución de las muestras en el gel de poliacrilamida-----	44
VII.	Análisis fisicoquímicos de los medios condicionados-----	54
VIII.	Análisis de características nanomecánicas de <i>E. histolytica</i> -----	85

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
1.	Amibólogos que han intervenido al conocimiento de <i>E. histolytica</i> -----	3
2.	Distribución mundial de <i>E. histolytica</i> -----	6
3.	Estadios de <i>E. histolytica</i> -----	8
4.	Ciclo de vida de <i>E. histolytica</i> -----	9
5.	Amibiasis del recto-----	11
6.	Microorganismos presentes en distintos segmentos del tracto gastrointestinal-----	16
7.	Mecanismo de acción desplegado por las bacterias probióticas-----	18
8.	Diagrama de los beneficios de los probióticos sobre el huésped-----	19
9.	Mecanismo de acción de los probióticos-----	19
10.	Esquema del modelo de acción de bacteriocinas de clase IIa -----	23
11.	Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos -----	24
12.	Aplicación de cepa productora de bacteriocinas y bacteriocinas purificadas-----	25
13.	Diseño experimental-----	35
14.	Análisis al MFA-----	46
15.	Cinética de crecimiento de <i>E. histolytica</i> bajo condiciones axénicas <i>in vitro</i> -----	48

Figura	Descripción	Página
16.	Cinética de enquistamiento de <i>E. histolytica</i> bajo condiciones axénicas <i>in vitro</i> -----	49
17.	Cinética de crecimiento de probióticos ( <i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. plantarum</i> y <i>Bifidobacterium longum</i> )-----	50
18.	Rendimiento celular de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> en presencia de FEP-----	52
19.	Rendimiento celular de ESQ de <i>E. histolytica</i> en presencia de FEP-----	52
20.	Reacción de Prueba de Biuret-----	53
21.	Cuantificación de proteínas y ácidos grasos-----	54
22.	Electroforesis en gel de poliacrilamida de bacteriocinas de <i>L. casei</i> -----	55
23.	Electroforesis en gel de poliacrilamida de bacteriocinas de <i>L. plantarum</i> -----	56
24.	Rendimiento celular de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> en presencia de bacteriocinas-----	58
25.	Rendimiento celular de ESQ de <i>E. histolytica</i> en presencia de bacteriocinas-----	58
26.	Observación de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> en fase logarítmica al Microscopio óptico-----	59
27.	Observación de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> en fase estacionaria al Microscopio óptico-----	60

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
<b>28.</b>	Comparación del patrón de reacción con calcoflúor de ESQ en presencia de FEP y bacteriocinas-----	61
<b>29.</b>	Aspecto de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> en fase logarítmica observados al MEB -----	63
<b>30.</b>	Aspecto de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> en fase estacionaria observados al MEB-----	64
<b>31.</b>	Aspecto de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> al final de la fase estacionaria observados al MEB-----	65
<b>32.</b>	Aspecto panorámico de cultivo de ESQ de <i>E. histolytica</i> , con 4 días de incubación, observados al MEB-----	66
<b>33.</b>	Aspecto de la topografía de ESQ de <i>E. histolytica</i> observados al MEB--	67
<b>34a.</b>	Micrografía en 3D de un trofozoíto de <i>E. histolytica</i> observado al MFA por el modo contacto-----	68
<b>34b.</b>	Aspecto de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> observados al MFA por el modo semi-contacto -----	71
<b>35a.</b>	Análisis de la topografía de la membrana celular de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> observados al MFA por el modo semi-contacto-----	72
<b>35b.</b>	Aspecto de la membrana celular de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> observados al MFA por el modo semi-contacto-----	74

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
<b>36.</b>	Aspecto de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> observados al MFA por el modo semi-contacto fijados con glutaraldehído-----	76
<b>37.</b>	Aspecto de ESQ de <i>E. histolytica</i> observados al MFA por el modo semi-contacto-----	78
<b>38.</b>	Aspecto de rugosidad de la pared celular de ESQ de <i>E. histolytica</i> observados al MFA por modo semi-contacto-----	80
<b>39.</b>	Gráfico de rugosidades de trofozoítos y ESQ de <i>E. histolytica</i> en presencia de bacteriocinas y FEP-----	81
<b>40.</b>	Gráfico de volúmenes de trofozoítos y ESQ de <i>E. histolytica</i> en presencia de bacteriocinas y FEP-----	82
<b>41.</b>	Gráfico de medidas de alturas de trofozoítos y ESQ de <i>E. histolytica</i> en presencia de bacteriocinas y FEP-----	84
<b>42.</b>	Gráfico de medidas de ancho de trofozoítos y ESQ de <i>E. histolytica</i> en presencia de bacteriocinas y FEP-----	84
<b>43.</b>	Gráfico de medidas de longitudes de trofozoítos y ESQ de <i>E. histolytica</i> en presencia de bacteriocinas y FEP-----	85

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>AHA</b>	Absceso hepático amibiano
<b>BAL</b>	Bacterias Ácido Lácticas
<b>cm</b>	Centímetros
<b>Da</b>	Daltones
<b>ESQ</b>	Estructura Semejante a Quiste
<b>FAD</b>	Food and Drug Administration
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization
<b>FE</b>	Factores Extracelulares
<b>FEP</b>	Factores Extracelulares de Probióticos
<b>g</b>	Gramos
<b>GRAS</b>	Generally Recognized As Safe
<b>h</b>	Hora
<b>kDa</b>	kiloDaltones
<b>L</b>	Litros
<b>Lb</b>	Libras
<b>M</b>	Molar
<b>MEB</b>	Microscopio Electrónico de Barrido
<b>MF</b>	Microscopio de Fluorescencia
<b>MFA</b>	Microscopio de Fuerza Atómica
<b>mg</b>	Miligramos
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MO</b>	Microscopio Óptico
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>nA</b>	Nanoamperes
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SINAVE</b>	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
<b>µg</b>	Microgramos
<b>µL</b>	Microlitros
<b>µm</b>	Micrómetros

## RESUMEN

La amibiasis es una infección parasitaria causada por *Entamoeba histolytica*. Representa una de las tres primeras causas de muerte por parásitos a nivel mundial. En México representa un problema de salud pública por su frecuencia, morbilidad, mortalidad y fácil dispersión. Muchos individuos infectados son portadores asintomáticos, lo que representa un reservorio para la diseminación a otros sujetos. Los pacientes infectados por *E. histolytica* eliminan trofozoítos no infecciosos y quistes infecciosos en sus heces. Los trofozoítos no pueden sobrevivir en el ambiente externo ni ser transportados a través del estómago si son ingeridos. La contaminación de alimentos y agua es la principal fuente para la transmisión de los quistes. La droga de elección para el tratamiento de la amibiasis y sus múltiples manifestaciones clínicas es el metronidazol, sin embargo presenta efectos secundarios indeseables en el humano y además existen reportes que indican que algunas cepas de *E. histolytica* presentan resistencia a esta droga, aunado a otros reportes que muestran actividad mutagénica y carcinogénica. Por esta razón se buscan alternativas terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad que no presenten efectos secundarios indeseables. Microorganismos producen sustancias antagónicas, por ejemplo, un amplio espectro de antibióticos y productos del metabolismo como ácidos orgánicos, moléculas quelantes de hierro (sideróforos) y bacteriocinas. Las bacteriocinas poseen espectros particulares de inhibición sobre el crecimiento de bacterias y protozoarios pero en enquistamiento tiene pocas investigaciones. En este proyecto se determinó la actividad biológica de bacteriocinas sobre el enquistamiento de *E. histolytica* HM1-IMSS bajo condiciones axénicas *in vitro* y se determinaron los cambios morfológicos tales como rugosidad, altura, ancho, volumen y longitud a través del microscopio de fuerza atómica (MFA) bajo el modo semi-contacto (tapping). Los datos se sometieron a un Análisis de Varianza (ANOVA) para determinar la significancia de los resultados.

## ABSTRACT

Amebiasis is a parasitic infection caused by *Entamoeba histolytica*. Represents one of the three leading causes of death by parasites worldwide. In Mexico, it represents a public health problem for the frequency, morbidity, mortality and easy dispersion. Many infected individuals are asymptomatic carriers, representing a reservoir for other subjects. Patients infected with *E. histolytica* eliminate infectious cysts and noninfectious trophozoites in their feces. Trophozoites can't survive in the external environment and be transported through the stomach if are ingested. The contamination of food and water is the main source for transmission cysts. The drug of choice for treatment of amebiasis and multiple clinical manifestations is metronidazole, but has undesirable side effects in humans and there are also recent reports that some strains of *E. histolytica* are resistant to this drug, together with other reports showing mutagenic and carcinogenic activity. For this reason, that is why other alternative substances for the treatment of this disease are sought. Microorganisms produce antagonistic substances, for example, broad spectrum antibiotics and metabolic products such as organic acids, iron chelating molecules (siderophores) and bacteriocins. Bacteriocins have particular inhibition spectra on bacterias and protozoa, both in encystation have a few research. In this project are determined the bacteriocins biological activity on *E. histolytica* HM1-IMSS encystation process *in vitro* under axenic conditions and the morphological changes such as roughness, height, width, volume and length by AFM under mode semicontact (tapping). The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) to determine whether there are significant differences.



## 1. INTRODUCCIÓN

La amibiasis es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la infección provocada por *Entamoeba histolytica* con o sin manifestaciones clínicas. Este parásito protozoario tiene una distribución cosmopolita y especialmente una prevalencia alta en países donde predominan condiciones socioeconómicas y sanitarias pobres. En países de primer mundo, esta infección se ha observado en turistas y en inmigrantes provenientes de zonas endémicas. La amibiasis intestinal ocupó el séptimo lugar como causa de morbilidad por casos nuevos en México (INEGI, 2008). A pesar de que el 90% de las infecciones amibianas son asintomáticas y autolimitantes, existe un estimado de 50 millones de casos de infección anuales. De acuerdo con la OMS, *E. histolytica* se encuentra clasificado como el tercer parásito responsable de muertes con un estimado de 100,000 defunciones al año (González *et al.*, 2012). *E. histolytica* posee dentro de su ciclo de vida dos formas, la fase móvil e infestiva denominada trofozoíto y una estructura de latencia o de resistencia llamada quiste, la cual está cubierta con una pared de quitina formada por N-acetil-D glucosa-2 aminas la cual presenta enlaces  $\beta$ -1-4, la cual le confiere protección al quiste (Chávez *et al.*, 2007). La droga de elección para el tratamiento de la amibiasis y sus múltiples manifestaciones clínicas es el metronidazol, sin embargo presenta efectos secundarios indeseables en el humano y además existen reportes recientes de que algunas cepas de *E. histolytica* presentan resistencia a esta droga (Barrón, 2007). Debido a la importancia médica que posee *E. histolytica* HM1-IMSS, se ha vuelto necesario tener un mayor entendimiento del parásito y su interacción con diferentes compuestos químicos, en busca de compuestos químicos que inhiban el proceso de infestación (fase de trofozoíto), o bien inhiban la inducción de la formación del quiste, la cual es considerada la fase de resistencia. Sin embargo, también es muy

importante que dichas sustancias químicas con actividad antiamebiana, presenten mínimos o nulos efectos secundarios adversos al huésped o portador. En la búsqueda de alternativas terapéuticas para la amebiasis, se han realizado investigaciones empleando las Bacterias Ácido Lácticas (BAL), algunas de las cuales se les considera probióticos, y una de las características de los metabolitos extracelulares de los probióticos es su capacidad de inhibir un amplio rango de microorganismos de importancia alimentaria y médica, como es el caso de *E. histolytica*. Las BAL, se caracterizan por metabolizar diversas fuentes de carbono y aminoácidos y producir ácidos grasos de cadena corta, peróxido de hidrógeno, ácido láctico, proteínas y péptidos a los cuales se les considera bacteriocinas, a las cuales se les confiere actividad antimicrobiana. En la búsqueda de alternativas terapéuticas para la amebiasis, recientemente se ha trabajado con las bacteriocinas, las cuales constituyen un grupo heterogéneo de péptidos que presentan una gran variedad de características fisicoquímicas y espectros de acción antimicrobiana, sin embargo la mayoría de las investigaciones están enfocadas a infecciones de origen bacteriano, no así para las afecciones de origen parasitario. La actividad antibacteriana de las bacteriocinas puede estar acompañada por lisis de células, como es el caso de la nisina A, la cual actúa desestabilizando o permeabilizando la membrana citoplasmática (Varo, 2010). Tradicionalmente, para observar diversas características típicas de los estadios de trofozoíto o quiste de *E. histolytica* se emplean diversas tinciones específicas y para realizar las observaciones de dicho material biológico, tradicionalmente se emplea el microscopio óptico o bien microscopio de fluorescencia, en el caso de observar la estructura interna se ha empleado principalmente el microscopio electrónico de transmisión y para realizar la observación topológica se emplea el microscopio de barrido (León, 2012). Sin embargo, en la actualidad se pueden realizar análisis de espectrometría de dichas células empleando nuevas herramientas microscópicas, como el Microscopio de Fuerza Atómica (MFA). El MFA es una herramienta capaz de permitir observar estructuras a resolución nanométrica y con la opción de analizar las propiedades físicas y mecánicas de los materiales a esta escala, permitiendo así el estudio de material biológico (Tapia, 2009).

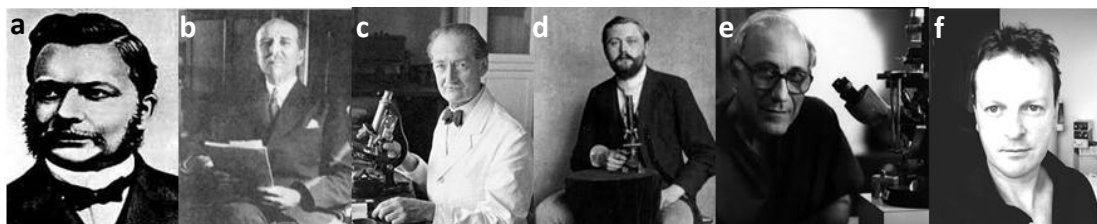
## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *Entamoeba histolytica*

#### 2.1.1 Generalidades e historia

*E. histolytica* es el agente causal de la amibiasis, constituye la tercera causa de mortalidad debida a infección parasitaria, después de la malaria y la esquistosomiasis, particularmente en países en vías de desarrollo como lo es México (Walsh 1986). Es una especie patógena para el ser humano y es la responsable de la disentería amebiana (Ríos Yuil *et al.*, 2012).

Han existido diversos investigadores que se han dedicado al estudio y conocimiento de *E. histolytica* a través del tiempo (Fig. 1). El cuadro clínico de amibiasis intestinal fue descrito en 1875 por primera vez por el médico ruso Fedor Aleksandrovich Lösch en San Petersburgo, Rusia; quien descubrió y publicó la presencia de un protozoo al cual nombró *Amiba coli*, la cual emitía pseudópodos en la materia fecal de un joven paciente agricultor, quien presentaba un cuadro de disentería crónica. Al analizar sistemáticamente la evolución del paciente, que presentaba dicho cuadro disentérico, encontró una gran cantidad de amibas en las heces y realizó una descripción microscópica de este microorganismo, al cual consideró como causante de la enfermedad (Fotedar *et al.*, 2007; Krestchmer, 1994; Tanyuksel, M. y Petri, W., 2003).



**Fig. 1. Amibólogos que han intervenido al conocimiento de *E. histolytica*.** a) F.A. Lösh, b) E. Brump, c) Dobel, d) Schaudinn, e) Diamond L. y f) Loftus B.

En México, los primeros relatos referente a la amibiasis datan de 1611, cuando el recién llegado Arzobispo y Virrey de la Nueva España Fray García Guerra, falleció al poco tiempo de su arribo a México debido a complicaciones en un cuadro caracterizado por fiebre y dolor en la zona hepática, muy probablemente debido a la formación de un absceso hepático amibiano (AHA) (Pinilla *et al.*, 2008).

Los términos de “disentería amibiana” y de “absceso hepático amibiano”, se dieron a raíz de una serie de estudios en diversos casos donde se encontraba involucrado este protozooario descrito por Lösch (Krestchmer, 1994; Pinilla *et al.*, 2008).

A través del tiempo este parásito recibió diversos nombres, en base a sus características morfológicas y fisiológicas, siendo el término más adecuado el que propuso el zoólogo alemán Fritz Schaudinn, quien acuñó el término *Entamoeba histolytica* debido a su capacidad de producir lisis tisular. En 1925 el parasitólogo francés Émile Joseph Alexandre Brumpt, basado en evidencias clínicas y epidemiológicas, diferenció a *Entamoeba histolytica* de *Entamoeba dispar*, llegando a establecer las características morfológicas que diferencian a *E. dispar* de *E. histolytica*.

Tardaron casi un siglo en establecer que sólo *E. histolytica* es la especie patógena. El ciclo de vida de *E. histolytica* fue descrito en 1928 por el zoólogo inglés Cecil Clifford Dobell. En los comienzos de los años setentas se empezaron a acumular datos que apoyaban la hipótesis de Brumpt, pero no fue hasta que Clark y Diamond en 1993, se percataron que las amibas aisladas de las personas enfermas se diferenciaban de las de individuos sanos por su capacidad de aglutinación con ciertas lectinas por sus patrones isoenzimáticos, diferencias antigénicas y diferencias en el ADN, todo esto en base a evidencia bioquímica, inmunológica y genética. Este hecho permitió que la comunidad científica adoptara a *E. dispar* como una especie distinta, pero morfológicamente idéntica a *E. histolytica*, lo cual fue aceptado por la OMS en 1997 (Ayeh-Kumi, 2001; Ximénez *et al.*, 2010; Pinilla *et al.*, 2008).

El 24 de febrero de 2005, fue publicado en la revista Nature el trabajo titulado “The genome of the protist *E. histolytica*” trabajo encabezado por Loftus B., quien lideró a un grupo internacional de 22 investigadores para concretar dicho trabajo. En 1925, Brunt propuso que existían dos especies distintas (una patógena y no patógena), aunque morfológicamente iguales. En 1961, Diamond logró el primer cultivo axénico y en 1978, Sargeant *et al.*, diferenció la variante patógena de *E. histolytica* de una no patógena mediante patrones electroforéticos de isoenzimas. En 1993, Diamond demostró que realmente eran dos especies diferentes y en 1997, la OMS recomendó que se diferencien las dos especies para efectos de diagnóstico y tratamiento, y cuando el diagnóstico sea por microscopía óptica, se reporte como *E. histolytica/dispar* (Gómez *et al.*, 2007).

Hasta hace unos años se consideraba que el 10% de la población mundial estaba infectada por *E. histolytica*. Sin embargo, con la aparición de los métodos de diagnóstico molecular, se ha confirmado que la mayor parte de estas infecciones son causadas por *E. dispar*. El 90% de los individuos asintomáticos se encuentran infectados por *E. dispar* y solo el 10% por *E. histolytica* (Ríos-Yuil *et al.*, 2012).

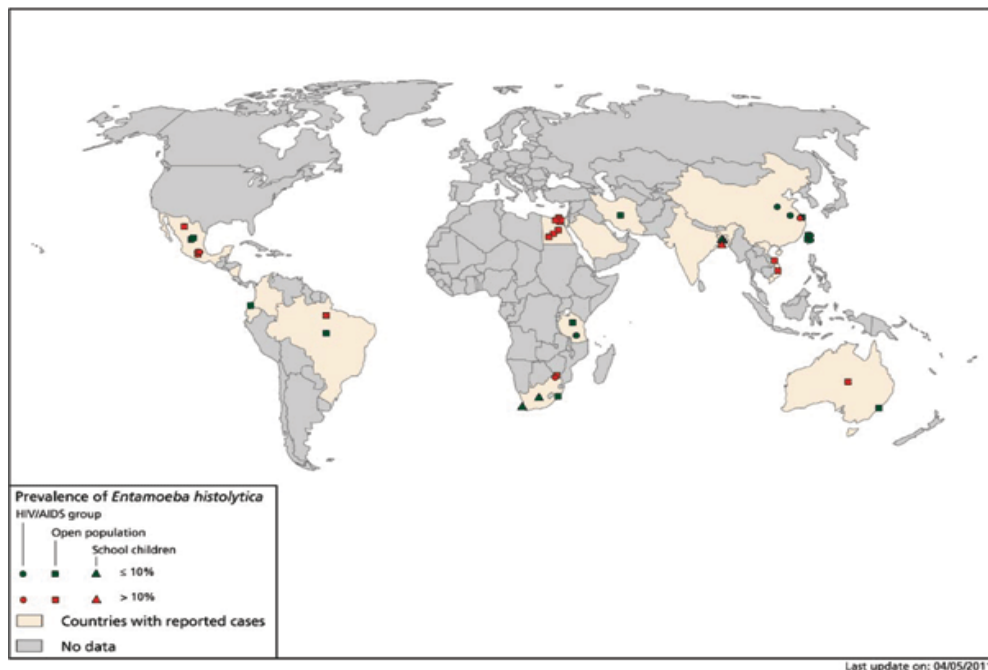
### 2.1.2 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de este parásito según Cavalier, (1998) es:

<b>Super-reino:</b>	Eukaryota
<b>Reino:</b>	Protozoa
<b>Subreino:</b>	Neozoa
<b>Infrarreino:</b>	Sarcomastigota
<b>Filo:</b>	Amoebozoa
<b>Subfilo:</b>	Conosa
<b>Infrafilo:</b>	Archamoeba
<b>Clase:</b>	Entamoebae
<b>Orden:</b>	Entamoebida
<b>Familia:</b>	Entamoebidae
<b>Género:</b>	<i>Entamoeba</i>
<b>Especie:</b>	<i>histolytica</i>

### 2.1.3 Epidemiología

La amibiasis es una de las parasitosis más tempranamente reconocidas y universales. Es la tercer causa de muerte en el mundo debida a infección por protozoarios parásitos, después del paludismo, la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis y la tercera causa de morbilidad después del paludismo y la tricomoniasis (Gómez *et al.*, 2007). Los pacientes infectados por *E. histolytica* eliminan trofozoítos no infecciosos y quistes infecciosos en sus heces. Los trofozoítos no pueden sobrevivir en el ambiente externo ni ser transportados a través del estómago si son ingeridos. Por este motivo, la principal fuente de contaminación de los alimentos y el agua es el portador asintomático que transmite los quistes (Murray *et al.*, 2007). *E. histolytica* presenta distribución mundial (Fig. 2). Es endémica en países con instalaciones y condiciones higiénico-sanitarias deficientes, donde no hay barreras entre las heces contaminadas con quistes, los alimentos y el agua. Las zonas endémicas son México y los países de Sudamérica, de África y del Sudeste Asiático. La mayoría de los casos de amibiasis en América del Norte y Europa son importados (Tanyuksel, M. and Petri, W., 2003).



**Fig. 2. Distribución mundial de *E. histolytica*.** Zonas endémicas donde se encuentra *E. histolytica*. Tomado de: Atlas of Human Infectious Diseases, Copyright © 2012 Blackwell Publishing Ltd.

Según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía, la amibiasis intestinal ocupó el séptimo lugar como causa de morbilidad por casos nuevos en México en el 2008 (INEGI, 2008) (Tabla I). De acuerdo a los datos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), existe una disminución constante en la incidencia de amibiasis intestinal en México, durante el período de 2005 a 2007, pasando de 716.71 casos por 100 mil habitantes en 2005 a 543.37 casos por 100 mil habitantes en 2007.

En México se considera 16 millones de portadores, 1.3 millones de enfermos y 10 mil a 30 mil muertes. En base a estos datos, puede afirmarse que la amibiasis se encuentra entre las primeras causas de morbimortalidad en el país (Gutiérrez y Muñoz, 1994; Martínez, 1987).

**Tabla I**  
**Incidencia de amebiasis en México (INEGI, 2006-2008)**

Indicador:		Incidencia de Amebiasis	Periodo desde:		2006	hasta:	2008
		Entidad 	Municipio 	2006 	2007 	2008 	
	<input type="checkbox"/>	Distrito Federal	Estatad	340.37	279.39	243.63	
	<input type="checkbox"/>	Durango	Estatad	552.08	406.24	361.45	
	<input type="checkbox"/>	Guanajuato	Estatad	346.26	257.74	254.16	
	<input type="checkbox"/>	Guerrero	Estatad	1,347.33	1,230.81	1,149.71	
	<input type="checkbox"/>	Hidalgo	Estatad	1,194.28	1,078.08	1,004.25	
	<input type="checkbox"/>	Jalisco	Estatad	493.68	325.30	269.81	
	<input type="checkbox"/>	México	Estatad	461.89	372.55	346.50	
	<input type="checkbox"/>	Michoacán de Ocampo	Estatad	360.87	266.69	262.04	
	<input type="checkbox"/>	Morelos	Estatad	872.62	796.62	726.38	
	<input type="checkbox"/>	Nayarit	Estatad	1,325.91	1,126.12	1,021.31	
	<input checked="" type="checkbox"/>	Nuevo León	Estatad	261.80	218.46	202.77	
	<input type="checkbox"/>	Oaxaca	Estatad	1,351.10	1,261.30	1,278.05	
	<input type="checkbox"/>	Puebla	Estatad	689.22	616.81	566.20	
	<input type="checkbox"/>	Querétaro	Estatad	574.19	499.63	392.95	
	<input type="checkbox"/>	Quintana Roo	Estatad	806.91	689.74	618.90	

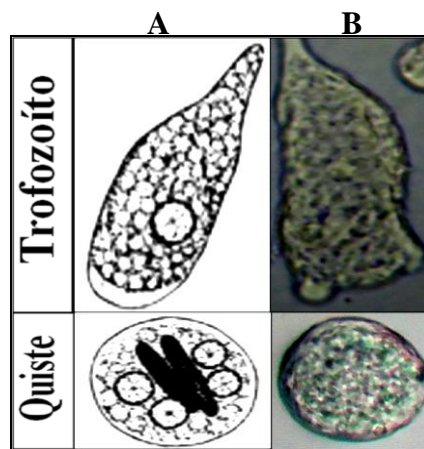
Términos de uso del Sitio | Términos de libre uso de la información del INEGI |

#### 2.1.4 Ciclo de vida

*E. histolytica* es un protozooario que presenta dos formas o estadios en su ciclo vital: quiste y trofozoíto (Fig. 3). Los quistes son estructuras redondeadas de 10 a 16 µm, con una cubierta gruesa y que presenta en su interior 1 a 4 núcleos.

El trofozoíto tiene un diámetro de 10 a 60  $\mu\text{m}$ , es móvil y se desplaza por medio de un pseudópodo largo (Gómez *et al.*, 2007).

El ciclo de vida de *E. histolytica* fue descrito por Dobell, 1928; incluye cuatro estadios consecutivos: trofozoíto, prequiste, quiste y metaquiste. El hombre es el principal reservorio de *E. histolytica* y la vía de transmisión es fecal-oral. El ciclo se inicia con la ingestión de un quiste maduro (infeccioso), el cual posee una pared rugosa a base de quitina que es reblandecida por la acción de los jugos gástrico y pancreático. El aumento de pH y la tripsina favorecen el rompimiento del quiste y la liberación de los trofozoítos en el intestino grueso dando lugar a cuatro trofozoítos metaquísticos que se multiplican por fisión binaria y pueden desarrollar infección invasora o no hacerlo (Gómez *et al.*, 2007; Ríos-Yuill *et al.*, 2012). En la luz del intestino, los trofozoítos eliminan las vacuolas alimenticias, se inmovilizan y se transforman en prequistes mediante la adquisición de una cubierta, para posteriormente convertirse en quistes inmaduros con un núcleo (Gutiérrez, 2008).

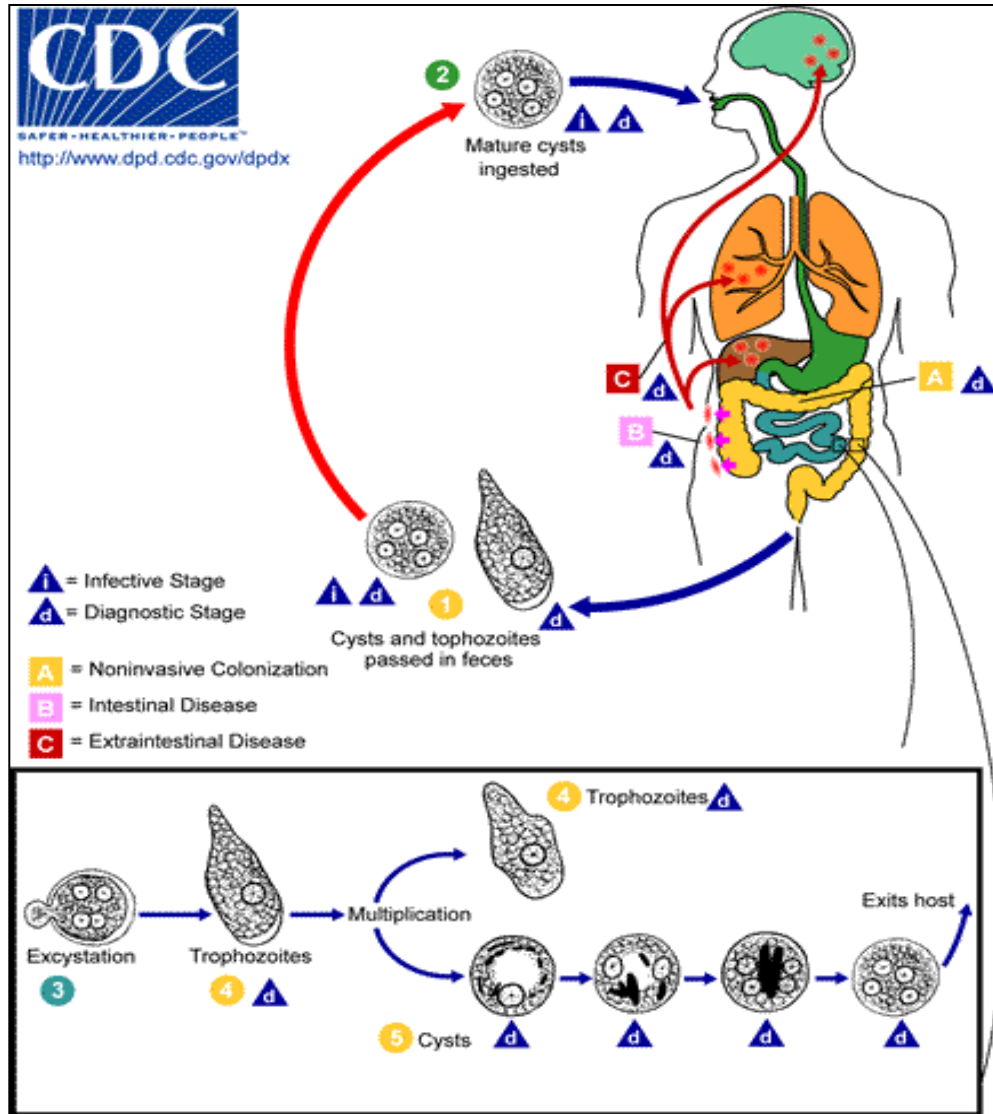


**Fig. 3. Estadios de *E. histolytica*.** A) Esquema de la fase de trofozoíto y quiste según CDC, B) Imagen de trofozoíto y quiste tomada al microscopio de contraste de fase.

En la mayoría de los casos se produce una infección asintomática en la que los trofozoítos permanecen formando agregados en la capa de mucina donde se produce enquistamiento sin producción de invasión. Los quistes no son invasivos, pero los trofozoítos pueden penetrar la mucosa gastrointestinal y posteriormente pueden emigrar e invadir otros órganos, causando infecciones extraintestinales (Barrón, 2007).



En aproximadamente el 10% de los casos invaden la pared del colon provocando a ese nivel una necrosis local intensa. Finalmente se transforman en quistes maduros tetranucleados que son eliminados por las heces, cerrándose el ciclo (Fig. 4).



**Fig. 4. Ciclo de vida de *E. histolytica*.** 1.-Los quistes maduros tetranucleados y trofozoitos son eliminados a través de las heces. 2.-Los quistes maduros son ingeridos a través de agua o alimentos contaminados. 3.-El desenquistamiento ocurre en el intestino delgado. 4.-A partir de cada quiste emergen ocho trofozoitos metaquisticos. 5.-A nivel de colon descendente ocurre el enquistamiento, los trofozoitos que atraviesan la mucosa intestinal (B) pueden diseminarse vía porta (C) al hígado, pulmón o cerebro y ocasionar amebomas. Tomada de: <http://www.cdc.gov/dpdx/>

### 2.1.5 Patogénesis

Existen factores que contribuyen a la generación de un estado patológico causado por esta amiba. El proceso de invasión puede ser ocasionado por mecanismos físicos y moleculares (Gómez *et al.*, 2007; Mancilla, 2010). La adherencia que posean estos trofozoítos es también un factor importante en la virulencia y patogénesis (Sehgal *et al.*, 1996) y su adherencia a las células blanco es un paso determinante para la citotoxicidad del parásito (Trejos y Castaño, 2009). La capa de mucina que recubre el epitelio del colon es el principal obstáculo para invadirlo, por lo que el parásito desarrolló sofisticados mecanismos para penetrarla. Las fases de la patogénesis son tres: colonización, disminución o disrupción de la mucosa y enlace-lisis de las células epiteliales del colon del hospedero.

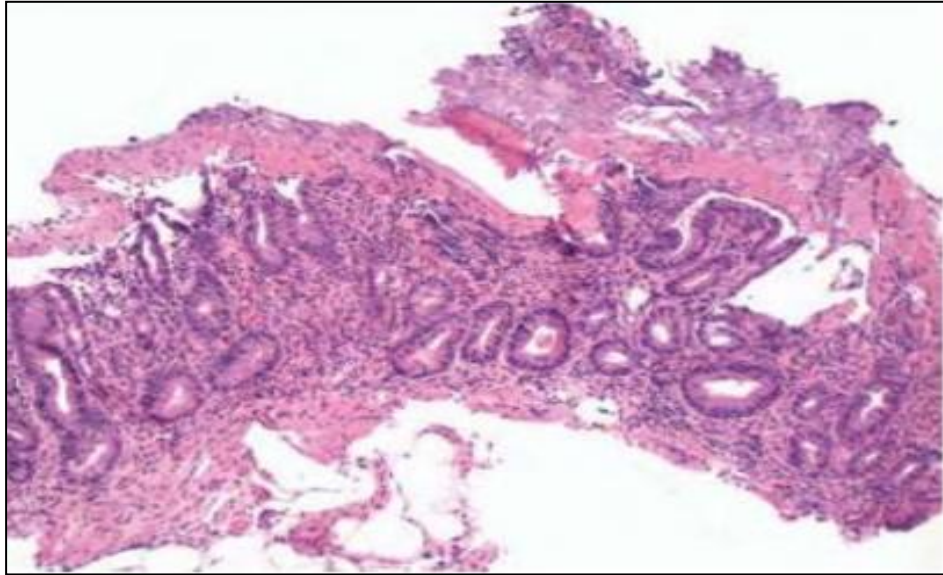
Las etapas para que ocurra la invasión de *E. histolytica* son:

Lesión inespecífica: engrosamiento de la mucosa, hiperplasia glandular y edema del estroma. Durante esta etapa ocurre la colonización y se inicia la fase de disrupción de la mucosa. La adherencia es difícil debido a las cargas negativas de la capa mucosa, pero por medio de la lectina galactosa-N-acetil-D-galactosamina se adhiere a ésta.

Depresión mucopénica: en esta etapa se aprecian pequeñas depresiones asociadas a pérdida de mucosa, con adherencia de los trofozoítos a ellas. Las células caliciformes encargadas de la producción de mucina agotan su capacidad de reponer la mucina destruida por el trofozoíto.

Lesión invasiva temprana con invasión superficial: durante esta fase se presentan fenómenos como: erosión epitelial superficial (Fig. 5), focos de microinvasión interglandular e infiltración de la lámina propia, completándose así el trío de acciones que implican la patogenia clásica.

Lesión invasiva tardía con ulceración profunda: a medida que avanza la invasión, la úlcera se extiende profundamente en un área mayor de la submucosa, dado que el tejido subyacente al epitelio interglandular ofrece menor resistencia, lo que da lugar a las típicas úlceras “en botón”.



**Fig. 5. Amibiasis del recto.** La mucosa del colon se observa moderadamente inflamada y muestra una erosión superficial.

### **2.1.6 Sintomatología**

Los síntomas son variables, dependiendo de factores del parásito y del hospedador. La amibiasis puede incluir diarrea, dolor estomacal, calambres estomacales, y se puede alterar con períodos de estreñimiento. La disentería amebiana es una forma severa de la amibiasis relacionada con dolor estomacal, evacuaciones sangrientas, fiebre y escalofríos. Alrededor de una de cada 10 personas que están infectadas con la amibiasis se enferma. Tarda por lo general de una a cuatro semanas desde el momento que se ingiere el parásito hasta que se enferma. También puede ser que no se tenga síntomas de amibiasis, pero se puede ser portador de la enfermedad.

De acuerdo con Guerreiro, 2007 y Sáenz, 2013, las manifestaciones clínicas de la amibiasis se clasifica en:

Portador asintomático: Es la más frecuente, la infección se detecta en un examen de heces donde se observan quistes. Representa el 90% de los casos.

El portador posee el parásito y lo elimina por las heces; no tiene síntomas. Determina la propagación de la enfermedad porque los pacientes pasan desapercibidos.

Diarrea amebiana: Forma intestinal más leve, las deposiciones son blandas o incluso líquidas pudiendo, en algunos casos, producirse deshidratación. En las heces se observan estrías de moco y sangre con trofozoítos. También puede haber dolor de estómago. Esta forma de la enfermedad también pasa desapercibida por que desaparece en días y su benignidad no obliga a hacer ningún tipo de estudio que descubra el parásito causante.

Disentería amebiana: Se presenta en un porcentaje reducido de pacientes. Se caracteriza por dolor abdominal de intensidad variable, diarrea con heces pastosas o líquidas. La mucosa está inflamada con ulceraciones típicas.

Otras formas frecuentes de manifestaciones clínicamente graves son:

Colitis fulminante: En un 5-10% de los casos. Afecta en especial a personas desnutridas o inmunodeprimidas y recién nacidos. El colon tiene ulceraciones. Se presenta los mismos síntomas del cuadro disentérico, a los que se agrega fiebre alta y deshidratación. Sin tratamiento el desenlace es fatal.

Apendicitis amebiana: Se presenta un cuadro similar a una apendicitis bacteriana pero acompañado de diarrea hemorrágica.

Ameboma: Es una lesión pseudotumoral que sangra con facilidad y puede producir obstrucción. Clínica y radiológicamente simula un cáncer de colon.

Amebosis extraintestinal: El punto de partida es el colon y la diseminación puede hacerse por extensión a zonas próximas o por vía sanguínea.

La forma más frecuente es el absceso hepático amebiano, en la cual se produce destrucción del tejido. La amebosis pleuropulmonar es una complicación frecuente del absceso hepático (Guerrero, 2007; Sáenz, 2013).

### 2.1.7 Tratamiento

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda diferenciar a *E. histolytica* de *E. dispar* y dar el tratamiento de manera aprobada, ya que un tratamiento innecesario podría favorecer el desarrollo de resistencia por parte de *E. histolytica*. Por lo tanto, la profilaxis para la infección por *E. histolytica* con amebicidas no es recomendada bajo ninguna circunstancia. El metronidazol es la droga de elección debido a que presenta una rápida absorción intestinal, una excelente biodisponibilidad en tejido y una buena penetración en el absceso (González *et al.*, 2012). El uso de este tipo de droga actúa contra los trofozoítos de *E. histolytica* pero es incapaz de penetrar la pared de los quistes. Sin embargo, una de las desventajas que presenta esta droga es que tiene múltiples efectos secundarios indeseables en los humanos, tales como: reacciones gastrointestinales, reacciones alérgicas, reacciones del sistema nervioso, trastornos mentales, así como daños transitorios de la visión y hepatobiliares. El uso indiscriminado de tratamientos puede provocar el riesgo de resistencia en el futuro por parte del parásito (Barrón, 2007; Santiago, 2010).

Existen otros amebicidas que pueden producir toxicidad, efectos secundarios indeseables y resistencias, por lo que se ha dado a la búsqueda de tratamientos alternativos para combatir este parásito. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO (Food and Agriculture Organization, por sus siglas en Inglés) y la OMS han indicado con evidencia científica el potencial de los probióticos que proporcionan beneficios en la salud y son seguros para uso humano (FAO/OMS, 2002).

La aparición de algunos riesgos de salud pública sugiere un importante papel de los probióticos eficaces en la mitigación de la enfermedad. Por ejemplo, la capacidad de las bacterias probióticas para apoyar el sistema inmunológico. Las infecciones son otra área con gran potencial para los probióticos. Los patógenos transmitidos por nuevos alimentos se han convertido en frecuentes y potencialmente mortales.

Las resistencias múltiples a los antibióticos son una amenaza continua en la lucha contra las infecciones una vez tratadas. La prevención de las infecciones antes de que ocurran es claramente la mejor alternativa. Ciertos probióticos pueden ser un enfoque rentable y seguro que añade una barrera contra la infección microbiana (Sáenz, 2013).

## **2.2 Probióticos**

El término probiótico se define como: “organismos vivos, principalmente bacterias, usados en forma de suplementos nutricionales que tras ser ingeridos en cantidades suficientes pueden mejorar el equilibrio microbiano en el intestino de las personas o animales que los ingieren provocando efectos favorables sobre su salud más allá de los efectos nutricionales tradicionales” (Amores *et al.*, 2004). Los probióticos ejercen su actividad antimicrobiana a través de prevenir la colonización intestinal de patógenos a través de la inhibición competitiva, disminuyendo el pH intestinal; produciendo metabolitos que previenen el crecimiento de patógenos, entre los cuales destacan ácidos grasos libres, péptidos antibacterianos, ácido láctico, biosurfactantes; y además, incrementan la presencia de oxidantes como el peróxido de hidrógeno. Asimismo, los probióticos inhiben la invasión bacteriana y bloquean la adhesión y translocación de los patógenos del epitelio (Sáenz, 2013).

La alteración de la microbiota intestinal (Tabla II) causada por las BAL o denominados también como probióticos, influyen directa e indirectamente en el estado de salud por la producción de vitaminas y ácidos grasos de cadena corta, degradación de sustancias alimenticias no digeridas, estimulación de la respuesta inmune y protección frente a microorganismos enteropatógenos (Lee and Salminen, 1995).

Se han considerado a las BAL como bacterias no patógenas (Saito, 2004), juegan un papel importante en la industria de los alimentos y productos fermentados, mejoran la calidad sanitaria del alimento al inhibir la biota competitiva la cual incluye a los microorganismos patógenos (Cintas *et al.*, 2001). Estas bacterias comprenden un

número elevado de microorganismos Gram positivas, cuya característica principal es la producción de ácido láctico a partir de carbohidratos. Las BAL son anaerobias o aerotolerantes, no formadoras de esporas, catalasa negativa, no reductoras de nitratos, tolerantes a la presencia de CO<sub>2</sub>, nitritos y concentraciones altas de sal y valores de pH bajos (Salminen *et al.*, 1993).

**Tabla II**

Características de la microbiota del tracto gastrointestinal (Rastall, 2004)

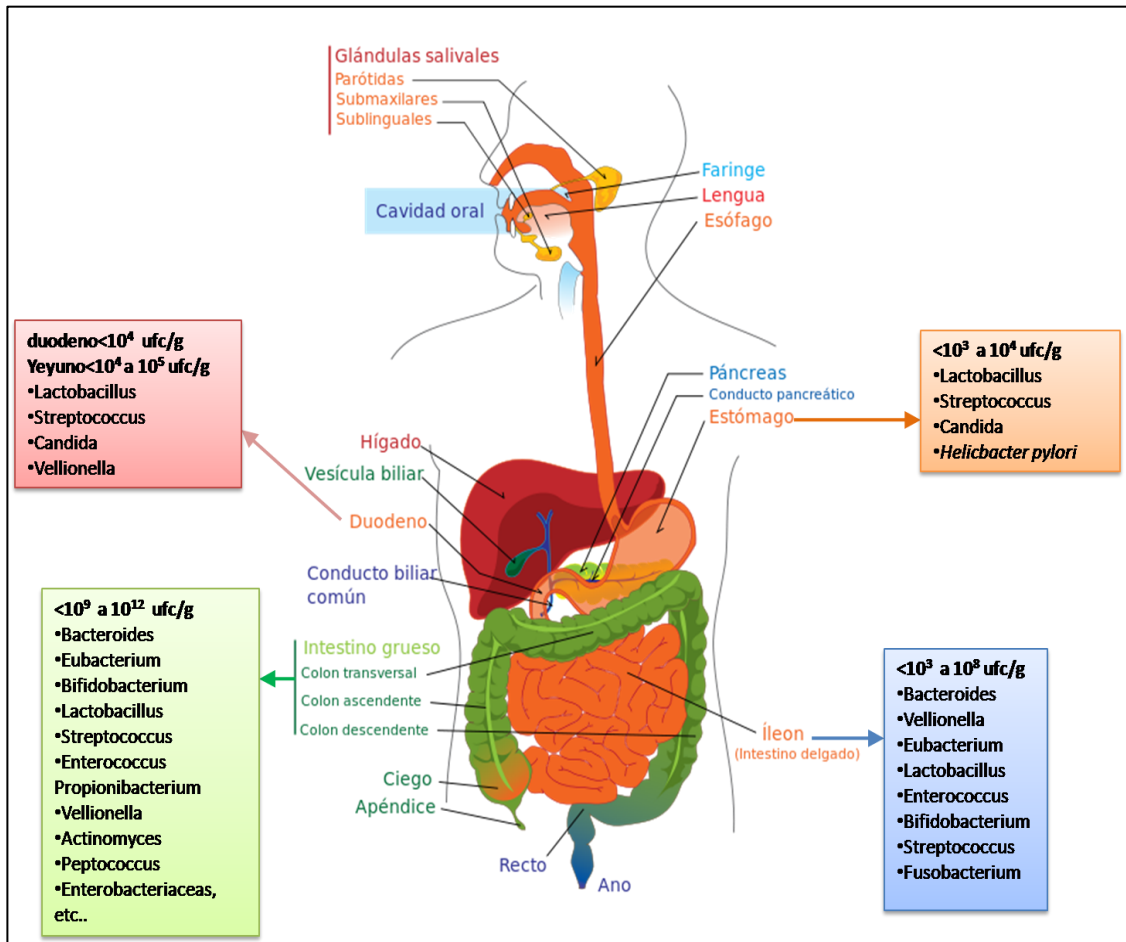
Tracto gastrointestinal	Características de la microbiota	Ejemplos
<b>Estómago</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muy bajo número de bacterias</li> <li>• Presencia de anaerobios facultativos</li> <li>• pH ácido</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lactobacilos</li> <li>• Estreptococos</li> </ul>
<b>Intestino delgado</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor carga bacteriana</li> <li>• Presencia de enterobacterias</li> <li>• Anaerobios y anaerobios facultativos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactobacillus</i></li> <li>• Estreptococos</li> <li>• <i>Bifidobacterium</i></li> <li>• Bacteroides</li> <li>• <i>Clostridium spp.</i></li> </ul>
<b>Colon</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Región con mayor carga bacteriana</li> <li>• Presencia de anaerobios estrictos, enterobacterias y anaerobios facultativos, en menor medida.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peptococos</li> <li>• <i>Bifidobacterium</i></li> <li>• Bacteroides</li> <li>• <i>Clostridium spp.</i></li> </ul>

Los géneros de importancia son: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Entereococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus* y *Weissella* (Rojas y Vargas, 2008; Parada *et al.*, 2007; Carr *et al.*, 2002; Farnworth, 2001; Cintas *et al.*, 2001; Klaenhammer y Sutherland, 1980).

El efecto benéfico se lleva a cabo a través del antagonismo que impide la multiplicación de otros microorganismos presentes en el colon, como microbiota normal del alimento o algún patógeno que se transmita por este producto alimenticio. Este antagonismo se debe a la competencia por los nutrientes, los sitios de adherencia, la producción de metabolitos que afectan su desarrollo, mediante la inmunomodulación que protege al huésped de las infecciones provocando un aumento de inmunoglobulinas (Pardio, 1994).

Las BAL son nativas del tubo digestivo de mamíferos, también se encuentran en boca, y vagina, en ambientes ricos en nutrientes como vegetales, productos de la pesca, lácteos

fermentados y productos cárnicos como parte de la microbiota normal del alimento (Tabla II y Fig. 6).



**Fig. 6. Microorganismos presentes en distintos segmentos del tracto gastrointestinal.** Diversidad de microorganismos que se encuentran en el tracto gastrointestinal. Elaboración propia.

### 2.2.1 Importancia de los probióticos

Elie Metchnikoff, científico ruso, que recibió el Premio Nobel en 1908 por sus estudios en inmunidad celular, descubrió cualidades beneficiosas para la salud en la fermentación de la leche. Él observó que los lactobacilos transformaban la lactosa en ácido láctico, y que dicha acidez confería un ambiente hostil para las bacterias patógenas. Metchnikoff se volvió un firme defensor del concepto de que la dieta puede proteger el organismo humano de la invasión de patógenos y en consecuencia mejorar y prolongar la calidad de vida (Sáenz, 2013).



La colonización de probióticos en el intestino delgado de los humanos ha permitido que en algunos microorganismos patógenos se vea desfavorecida su reproducción en el interior intestinal, generando un fenómeno denominado antibiosis (Babel, 1977). Las primeras observaciones de antibiosis microbianas realizadas por Pasteur y Joubert (1877) permitieron vislumbrar las posibilidades terapéuticas de los fenómenos de antagonismo. Posteriormente, Rogers en 1928 identificó una sustancia de naturaleza peptídica, llamada nisina, producida por *Lactococcus lactis*, que inhibía a microorganismos Gram positivos, incluyendo patógenos y alterantes de alimentos.

### **2.2.2 Mecanismos de acción de los probióticos**

Los probióticos actúan por diferentes mecanismos que podemos clasificar en:

**a) Intraluminales:**

- Incrementa la secreción mucosa e inhibición de la adherencia de las bacterias patógenas.
- Acidificación del colon por fermentación de nutrientes.

**b) Epiteliales:**

- Incremento de la función de barrera del epitelio.
- Disminuye la permeabilidad favoreciendo el cierre de las uniones intercelulares.

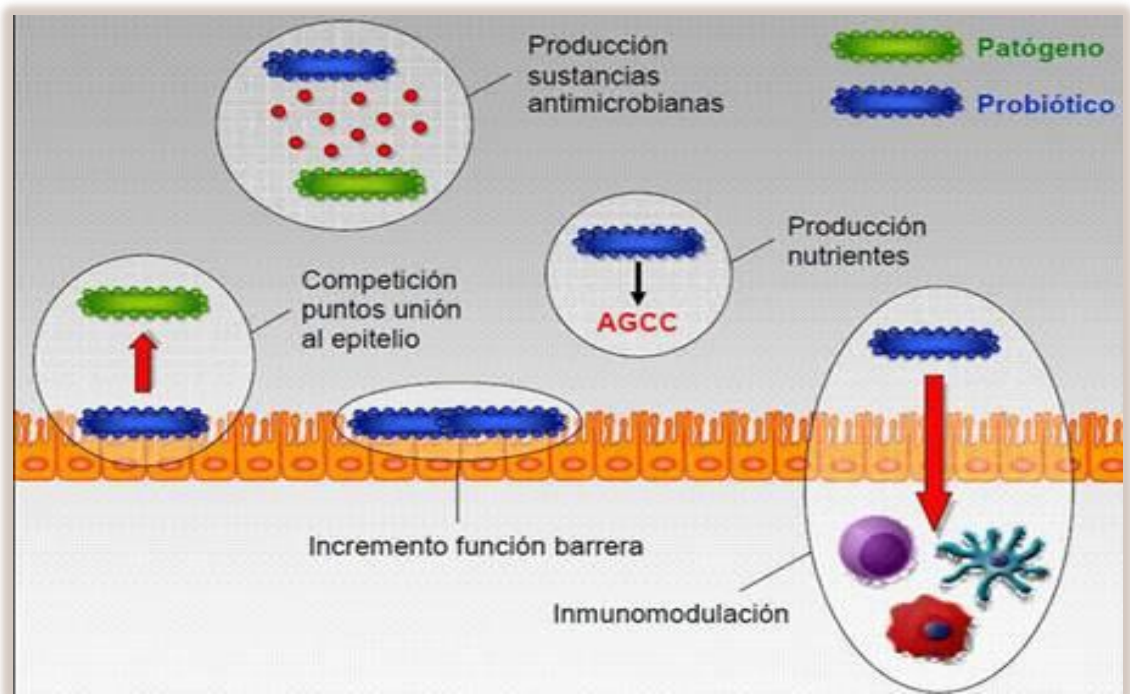
**c) Inmunomoduladores:**

- Acciones inmunomoduladoras.
- Secreción de bacteriocinas.
- Estimula la respuesta mucosa al estrés.
- Inhibición de la hipersensibilidad visceral.

Aún no se ha descrito el mecanismo exacto por medio del cual los probióticos ejercen su acción, por lo que es importante para ello entender sobre la fisiología y microbiología del tracto gastrointestinal y del proceso digestivo (Parvez *et al.*, 2006). El efecto antagónico de las BAL contra las bacterias patógenas e incluso deterioradoras de alimentos se conoce desde hace muchos años (Fernández, 2009). Por la producción de sustancias con efectos antimicrobiano (Batrefoot and Klaanhammer, 1983), reducen el pH del lumen intestinal; bacterias susceptibles a estos mecanismos son *Escherichia coli*, *Streptococcus sp.* y *Salmonella sp.* entre otras (Amores, 2004). Algunas cepas de BAL son capaces de producir compuestos denominados bacteriocinas, utilizadas como conservadores naturales de alimentos

e incluso como antimicrobianos. Desde hace algunos años ha crecido el interés en estas proteínas, dando lugar al descubrimiento y caracterización de un gran número de estos compuestos, su función ecológica, organización y regulación genética (Parada *et al.*, 2007; Savogado *et al.*, 2006; Parvez *et al.*, 2006).

Pruebas con animales y estudios *in vitro* han demostrado que las cepas probióticas pueden ejercer una acción protectora en el intestino al adherirse y colonizar el epitelio del mismo; compiten por los receptores, lo que previene la colonización de los patógenos. Este mecanismo no ha sido esclarecido del todo (Varo, 2010), (Fig. 7).



**Fig. 7. Mecanismo de acción desplegado por las bacterias probióticas.** Ilustración de las diferentes acciones de las bacterias probióticas que facilitan el desarrollo de las mismas. Tomado de: [http://bvs.sld.cu/revistas/mciego/vol19\\_supl2\\_2013/rev/t-15.html](http://bvs.sld.cu/revistas/mciego/vol19_supl2_2013/rev/t-15.html)

En un documento reciente se demostró que los liofilizados de medios condicionados con *Lactobacillus plantarum*, *L. casei rhamnosus* y *Bifidobacterium longum* inhiben el crecimiento axénico *in vitro* de *E. histolytica* HM1-IMSS (Barrón *et al.*, 2006). Lo que fue atribuido a que estas BAL presentan la capacidad para producir sustancias como las bacteriocinas, las cuales pudieron haber quedado suspendidas en los medios condicionados que fueron liofilizados (Barrón *et al.*, 2008; Sáenz, 2013).

Se ha demostrado la eficiencia del uso de las BAL, las cuales son consideradas como probióticos para prevenir las infecciones intestinales, y aportar efectos benéficos para la salud y estimular el sistema inmunológico a nivel intestinal y ayudar a la buena digestión (Fig. 8 y 9).

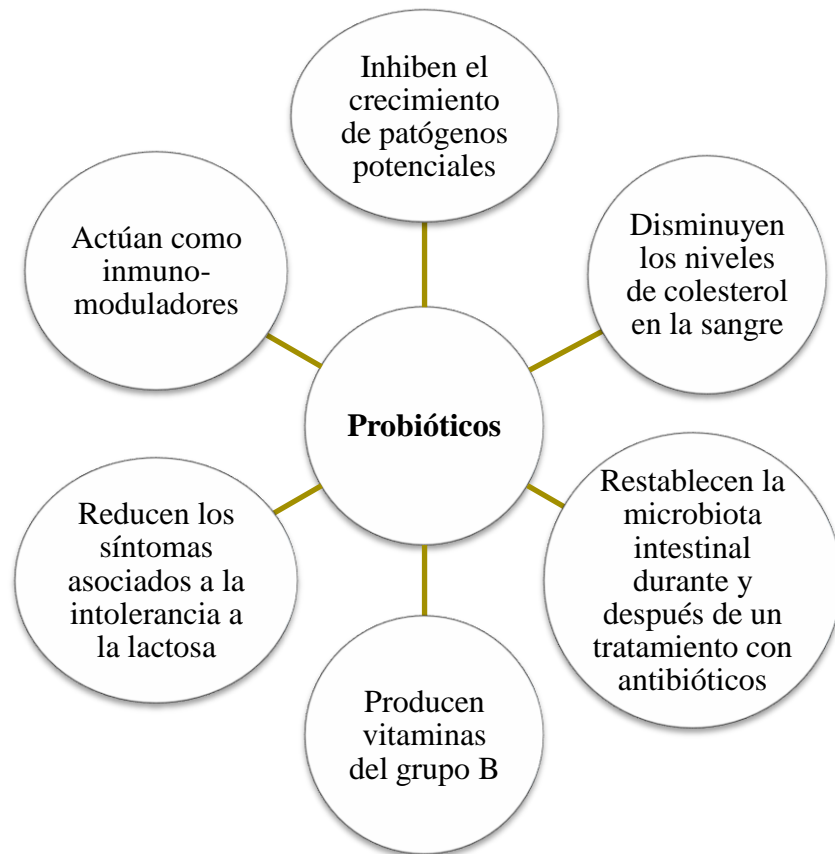


Fig. 8. Diagrama de los beneficios de los probióticos sobre el huésped.

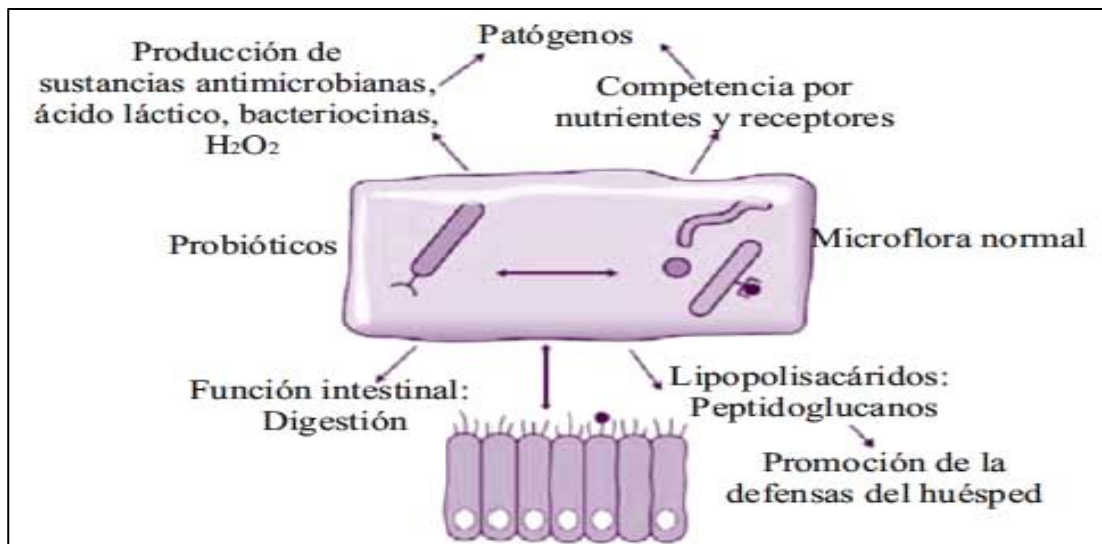


Fig. 9. Mecanismo de acción de los probióticos. Diagrama de mecanismos de acción de los probióticos contra patógenos (Guzmán *et al.*, 2012).

## 2.3 Bacteriocinas

Se describieron por primera vez en bacterias Gram negativas, en las que se describieron las colicinas producidas por *Escherichia coli* (Gratia, 1925) y, posteriormente, en bacterias Gram positivas (Jacob *et al.*, 1953; Tagg *et al.*, 1976). Las BAL están consideradas como bacterias Gram positivas y su interés en los últimos quince años se ha centrado en la producción de bacteriocinas para el uso de conservadores naturales de alimentos, con el fin de aumentar la vida útil y mejorar la calidad higiénica de los mismos (Cleveland *et al.*, 2001).

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosómicamente por las bacterias productoras. En la mayoría de los casos la producción de bacteriocinas es regulada solo bajo ciertas condiciones de crecimiento, por lo que aspectos como la composición del medio de cultivo, temperatura, pH y actividad de agua podrían ser cruciales en la producción de bacteriocinas (Nahuelquín, 2008). Recientemente estas proteínas han despertado gran interés en la investigación. Las bacteriocinas son sustancias antimicrobianas producidas por BAL, de naturaleza peptídica y activas, relacionados taxonómicamente con la especie productora (Tagg *et al.*, 1976). La biosíntesis de bacteriocinas ocurre en la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, y en la mayoría de los casos guarda relación con la biomasa producida. Ciertos componentes específicos del medio de cultivo interfieren sensiblemente en la producción de alguna bacteriocina individual (Moreira, 1993).

Las bacteriocinas se han encontrado en casi todas las especies bacterianas estudiadas hasta la fecha y se ha observado que dentro de una misma especie se pueden producir diferentes tipos de bacteriocinas. Debido a esto, existe una enorme diversidad de este tipo de sustancias. Las bacteriocinas son consideradas como péptidos biológicamente activos que presentan efectos bactericidas. Poseen espectros particulares de inhibición, esta característica permite su uso en la industria de los alimentos en procesos que requieren la inhibición del crecimiento de bacterias que alteran los alimentos o patógenos como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhi* o *Staphylococcus spp* (Varo, 2010).

La producción de bacteriocinas de un espectro antibacteriano relativamente amplio, es propia de las bacterias lácticas de origen alimentario. Ciertas investigaciones indican que la producción de bacteriocinas constituye un fenotipo bastante extendido en las bacterias lácticas (Naz y Rasool, 2013). De acuerdo a su definición, las bacteriocinas se inactivan, al menos por una enzima proteolítica, como lo son de origen pancreático (tripsina y alfa-quimiotripsina) y gástrico (pepsina). Algunas bacteriocinas son sensibles a otras enzimas como lipasas, amilasas y fosfolipasas. Generalmente las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas son termoresistentes, lo que les permite mantener su actividad antimicrobiana a temperaturas similares a las de pasteurización y esterilización de la leche. Esto sugiere que su actividad recae en estructuras pequeñas y poco complejas (Moreira, 1993).

Sustancias antagonicas han sido reportadas de células procariotas y eucariotas como un esfuerzo para contener otros organismos que viven en los mismos lugares ecológicos para inhibición competitiva antagonista. La producción de estas sustancias es una estrategia biológica de defensa natural (Naz y Rasool, 2013). La nisina y pediocina son las bacteriocinas mejor estudiadas de los productos de BAL y son utilizadas en la industria de alimentos (Rajaram *et al.*, 2010; Vamanu y Vamanu, 2010).

Los análisis de la composición y secuencias aminoacídicas de las bacteriocinas de las bacterias lácticas indican que existen 3 grupos de moléculas: **a)** lantibióticos, que son polipéptidos de bajo peso molecular con aminoácidos poco usuales como deshidroalanina, deshidrobutirina, lantionina y  $\beta$ -metil-lantionina y en éste grupo se encuentran la nisina, lacticina 481 y sakacina M, **b)** constituido por péptidos de bajo peso molecular sin aminoácidos modificados, incluyendo lactocina A, lactocina F y diplococcina, **c)** formado por proteínas de peso molecular más alto como la caseicina 80 (Moreira, 1993).

De acuerdo a las características estructurales y biológicas de las bacteriocinas de las BAL, Yang *et al.* (2014) clasifica a las bacteriocinas en diferentes clases (Tabla III):

**Tabla III**

Clasificación de bacteriocinas de bacterias Gram positivas (Modificada de Yang *et al.*, 2014)

Clase	Características	Bacteriocinas	PM (Da)	Cepa productora	Referencias
I	Las bacteriocinas son modificadas post-traduccionales.  Péptidos lineares o globulares que contienen lantionina, β-metil-lantionina y ácidos amino dehidratados.	-Nisina A	3352	<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>	Field <i>et al.</i> , 2012
		-Nisina U	3029	<i>Streptococcus brevis</i>	Wirawan <i>et al.</i> , 2006
		-Nisina Z	3493	<i>Lactococcus lactis subsp. Lactic</i>	Mulders <i>et al.</i> , 1991
		-Mersacidina	1824	<i>Bacillus sp.</i> Y85,54728	Chatterjee <i>et al.</i> , 1992
		-Labirintopeptina A2	1922	<i>Actinomaduras sp.</i>	Meindl <i>et al.</i> , 2010
		-Subtilosina A	3399	<i>Bacillus subtilis</i> 168	Babasaki <i>et al.</i> , 1985
II	Estables al calor  No son modificables  No contienen lantionina  Clase homogénea de péptidos pequeños  Clase IIa (pediocina)  Clase IIb (compuestos de dos péptidos)  Clase IIc (péptido circular)  Clase IId (Linear, péptido simple)	Pediocina PA-1	4629	Pediococcus acidilactici PAC-1.0	Henderson <i>et al.</i> , 1992
		Carnobacteriocina X	3602	Carnobacterium maltaromaticum C2	Tulini <i>et al.</i> , 2014
		Lactacina F	4755	<i>Lactobacillus spp.</i>	Fremaux <i>et al.</i> , 1993
		ABP-118	4096	<i>Lactobacillus salivarius subsp. salivarius</i> UCC118	Flynn <i>et al.</i> , 2012
		Carnociclina A	5862	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> UAL307	Martin-Visscher <i>et al.</i> , 2008
		Enterocina AS-48	7149	<i>Enterococcus faecalis</i>	Samyn <i>et al.</i> , 1994
		Epidermicina NI01	6074	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Sandiford and Upton, 2012
		Lactococcina A	5778	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	Holo <i>et al.</i> , 1991
III	Largos  Proteínas inestables al calor	Caseicina 80	42000	<i>Lactobacillus casei</i> B80	Muller and Radler, 1993
		Enterolisina A	34501	<i>Enterococcus faecalis</i> LMG2333	Nilsen <i>et al.</i> , 2003
		Helveticina J	37511	<i>Lactobacillus helveticus</i> 481	Joerger and Klaenhammer, 1990

**Clase I Lantibióticos:** Péptidos pequeños, menores a 5 kDa, termoestables y que se caracterizan por la presencia de aminoácidos no usuales en su composición. Se distinguen 2 tipos de lantibióticos: a) Tipo A, péptidos de 2164 a 3488 Da, de estructura terciaria tipo sacacorchos, anfipáticos y con 2 a 7 cargas positivas; b) Tipo B, péptidos de estructura globular, con tamaños comprendidos entre 1959 y 2041 Da, sin carga o cargados negativamente. La nisina A, fue el primer lantibiótico descrito en 1928, y fue aislada a partir de la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis subsp. lactis* (Moreira, 1993). Es la bacteriocina mejor caracterizada y pertenece al tipo A es un péptido de 34 aminoácidos y bajo peso molecular inferior a 5 kDa y es muy utilizada como conservador de alimentos y la única reconocida por la FDA con la categoría GRAS (Generally Recognized As Safe).

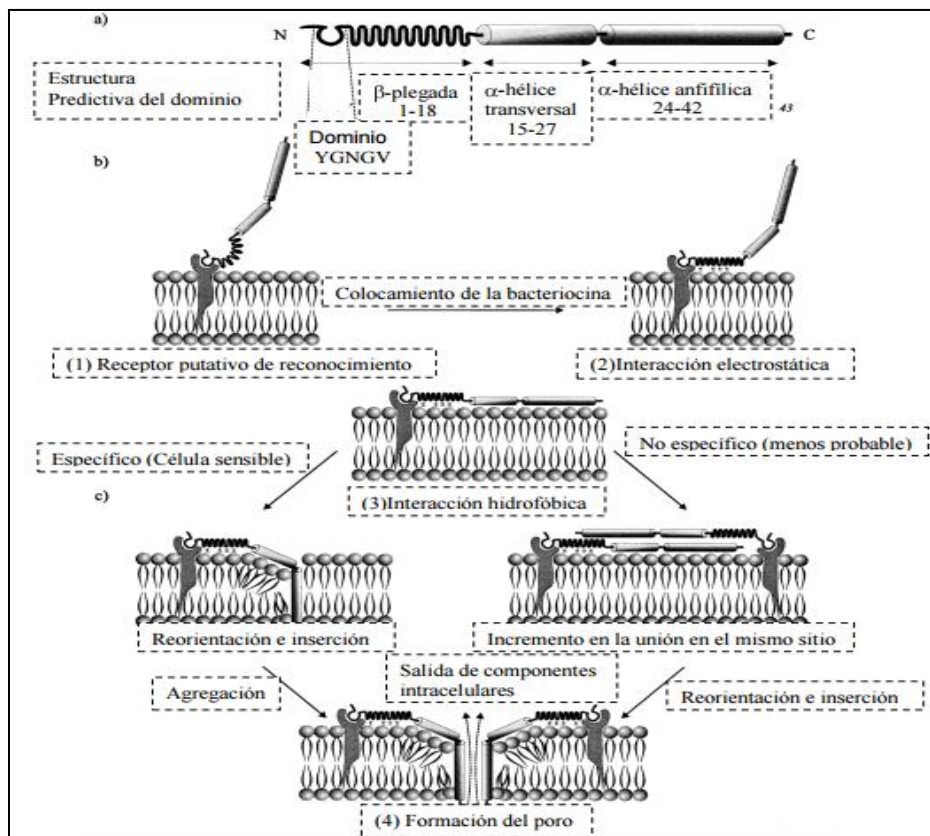
**Clase II Pequeños péptidos termoestables:** Péptidos (<15 kDa), estables al calor y que no contienen aminoácidos modificados en su estructura primaria. Junto con los lantibióticos es la clase más numerosa de bacteriocinas.

Clase IIa: péptidos activos. Tienen un papel importante en la capacidad de reconocimiento de la membrana de la célula blanco. Dentro de este grupo se encuentran: la pediocina PA-1/AcH (Fig. 10).

Clase IIb: estas bacteriocinas tienen una síntesis compleja cuya actividad biológica depende de la acción complementaria de dos péptidos distintos. Son formadores de complejos de poración y tienen actividad antimicrobiana cuando interactúan como un sistema de 2 péptidos.

Clase IIc: este grupo tiene, hasta el momento, un único representante: la lactococina B (Venema *et al.*, 1993).

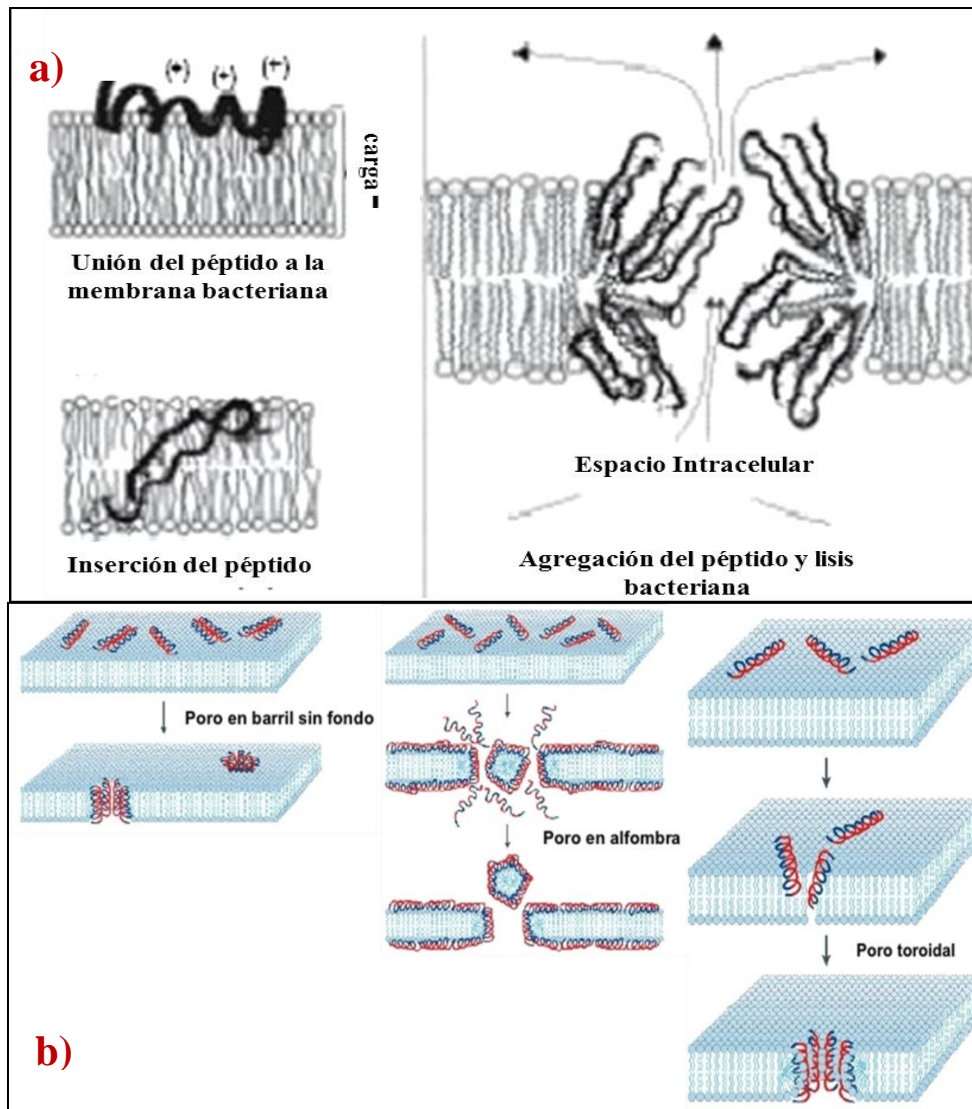
Clase IId: incluye todas aquellas bacteriocinas que no cumplen alguno de los requisitos exigidos en los grupos anteriores.



**Fig. 10. Esquema del modelo de acción de bacteriocinas de clase IIa.** Estructura y localización de dominios dirigidos con respecto a la membrana celular. a) dominios estructurales de la bacteriocina; b) posibles interacciones de cada dominio con la superficie de la membrana; c) inserción de la bacteriocina y formación de los poros hidrofílicos.



**Clase III Grandes proteínas termolábiles:** Proteínas de más de 15 kDa que están constituidas exclusivamente por aminoácidos no modificados y son sensibles al calor. La acción de las bacteriocinas sobre las células sensibles ocurre en dos fases: en la primera fase, la bacteriocina se adsorbe en receptores específicos y no específicos de la célula hospedadora. En este estadio las bacteriocinas son sensibles a las proteasas. En la segunda fase, ésta ya irreversible, la bacteriocina origina alteraciones celulares en las células sensibles de acuerdo con cada tipo de bacteriocina. De las dos bacteriocinas mejor conocidas, la nisina se sabe que actúa como despolarizante de las membranas bacterianas energizadas produciendo poros en la membrana lipídica (Fig. 11).

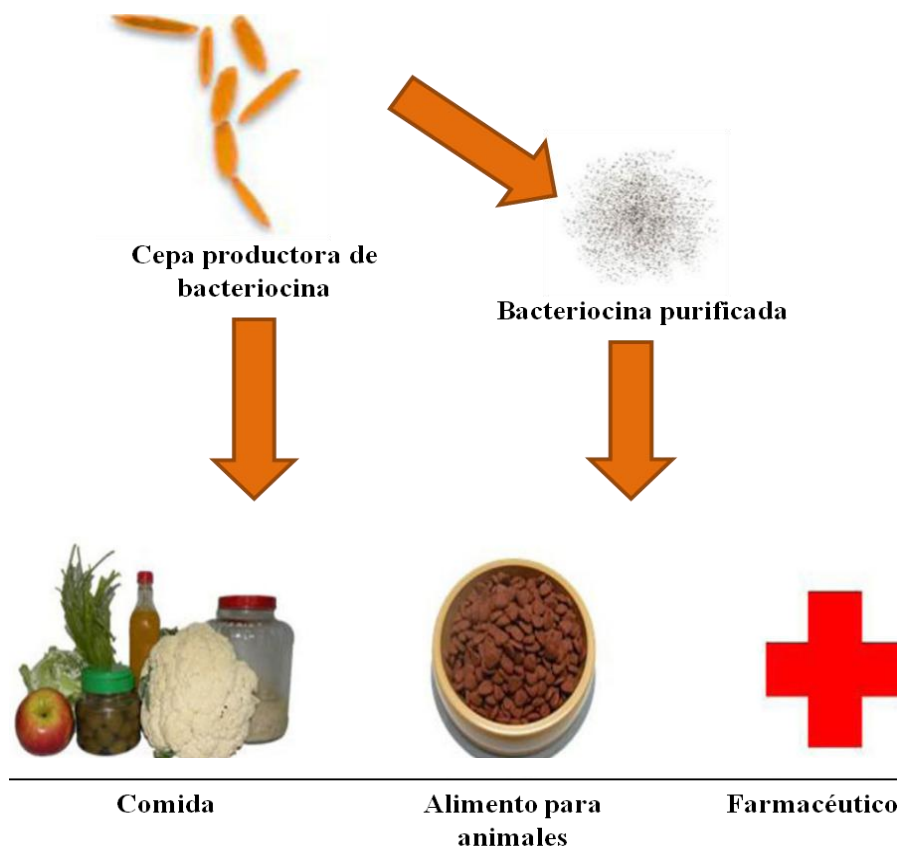


**Fig. 11. Mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos.** a) unión y mecanismo de acción de péptidos. b) Tipos de formación de poro en la membrana.



La lactocina A, actúa como la nisina, al aumentar la permeabilidad de la membrana citoplasmática y disipar el potencial de membrana de las células sensibles (Moreira, 1993). Aunque es difícil generalizar y establecer un método único de purificación de las bacteriocinas de las bacterias lácticas, los mejores resultados se obtienen con el basado en: 1) concentración de los sobrenadantes libres de células con sulfato amónico, 2) cromatografía de intercambio iónico, 3) cromatografía de interacción hidrofóbica y 4) cromatografía en fase reversa.

El aumento de la resistencia de los microorganismos a los diversos antibióticos generan la búsqueda de compuestos naturales no dañinos a la salud del consumidor, por lo que actualmente la utilización de las bacteriocinas como bioconservador en el control de microorganismos patógenos es de gran interés en la industria alimentaria y en otras áreas (Varo, 2010) (Fig. 12).



**Fig. 12. Aplicación de cepa productora de bacteriocinas y bacteriocinas purificadas.**  
Las bacteriocinas pueden ser utilizadas en comida, alimento para animales y en medicina.

## **2.4 Microscopías**

### **2.4.1 Microscopio Óptico (MO)**

El microscopio óptico es sumamente útil para observar objetos que se hallen fuera del límite de resolución del ojo humano (tamaño inferior a 100 nm). Este microscopio (también llamado compuesto, en oposición al simple que consta de una sola lente biconvexa y se conoce como lupa) consta de tres sistemas (Montalvo, 2010):

Sistema mecánico: está formado por aquellas piezas que no intervienen en la formación de la imagen ni en el camino de la luz (tornillos micro y macrométrico, columna, pié, platina, etc.).

Sistema de iluminación: lo integran aquellos componentes encargados de coleccionar la luz, dosificarla y dirigirla a través del preparado (espejo, condensador, diafragma).

Sistema óptico: incluye todos los elementos que colaboran en la ampliación de la imagen (objetivos y oculares, que son las lentes del microscopio).

### **2.4.2 Microscopio de Fluorescencia (MF)**

La fluorescencia es un proceso de interacción entre la radiación y la materia en el cual un material absorbe radiación de una fuente específica y muy rápidamente emite luz cuya energía es menor (de mayor longitud de onda) que la de la radiación que ha absorbido. Las moléculas fluorescentes (fluoróforos) absorben luz de una dada longitud de onda y emiten luz de otra longitud de onda, más larga.

Si un componente de este tipo es iluminado a su longitud de onda absorbente y visualizado a través de un filtro que sólo permita pasar la luz de longitud de onda igual a la de la luz emitida, el componente aparece brillante sobre un fondo oscuro. La intensidad y el color de la luz es una propiedad característica de la molécula fluorescente utilizada. Este tipo de microscopio se utiliza para visualizar partes de la célula (membrana plasmática, núcleo, vacuolas, retículo endoplásmico, etc.), estudiar procesos celulares (división celular, muerte celular, cambios en el potencial de membrana, endocitosis y exocitosis), localizar moléculas específicas como proteínas o lípidos (Morales, 2012).

### 2.4.3 Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)

El microscopio electrónico de barrido apareció en el año de 1965. Su fundamento radica en que los electrones emitidos por un cátodo de tungsteno pasan a través de una columna en la que se ha hecho un vacío de alrededor de  $10^{-7}$  Torr. En ella, el haz inicial es concentrado por una serie de lentes electromagnéticas (condensadora, objetivo) desde unos 25.000-50.000 nm hasta unos 10 nm. El haz electrónico es desplazado sobre toda la superficie de la muestra a modo de un pincel que iría barriendo la muestra con continuas idas y venidas. Esta motilidad del haz se consigue gracias a un sistema de bobinas de barrido situadas en la columna del instrumento.

Además del examen de muestras convencionalmente preparadas para el estudio de su superficie (MEB convencional), la microscopía de barrido tiene en la actualidad otras aplicaciones que resultan de gran interés en el campo biológico. Por ejemplo, hacer análisis cuantitativos de los componentes de la muestra, lo que se realiza mediante el análisis de los rayos X emitidos por la muestra tras su irradiación con el haz electrónico. Una segunda aplicación en el campo biológico es el análisis inmunocitoquímico de los componentes de la superficie de la muestra (Nieto, 2010).

El primer estudio de *Entamoeba invadens* (una amiba patógena de reptiles y empleada como modelo biológico de estudio para *Entamoeba histolytica*) al microscopio electrónico fue realizado por Siddiqui y Rudzinska en 1965; quienes describieron aspectos referentes a la membrana citoplasmática, membrana nuclear y detallaron los hallazgos citoplásmicos en el cual se destaca la ausencia de mitocondrias y aparato de Golgi; entre las estructuras citoplasmáticas que resalta se encuentran los cuerpos cromatoides los cuales describe como característicos de quistes, prequistes y trofozoítos con lento o nulo crecimiento. Posteriormente, Barker y Deutsch en 1958; en un estudio realizado por medio de microscopía electrónica y estudios histoquímicos demostraron que los cuerpos cromatoides en trofozoítos de *E. invadens* crecidos en un medio no axénico consisten principalmente de ácido ribonucleico y proteínas inespecíficas (Barrón, 2007).

#### **2.4.4 Microscopio de Fuerza Atómica (MFA)**

La microscopía de fuerza atómica es una técnica para la caracterización de superficies creada en 1986 por G. Binning, C. Quate y Ch. Gerber. Se basa en la creación de imágenes digitalizadas mediante la medición de las fuerzas repulsivas y atractivas entre los átomos de una punta y los de la superficie. Desde su aparición en los 80's, el Microscopio de Fuerza Atómica (MFA), ha sido un equipo importante para la elucidación de la microestructura de materiales. Basado en la interacción local entre la punta y la superficie de una muestra, proporciona imágenes tridimensionales de superficies con alta resolución espacial en tiempo real. Debido a esto, el MFA es utilizado en la caracterización de materiales para determinar sus propiedades físicas. El MFA trabaja en diferentes modos de operación como Tapping, Contacto e Imagen de Fase para obtener la morfología de la superficie de la muestra. También determina las propiedades físicas de los materiales como: viscoelasticidad, fuerza eléctrica y fuerza magnética (Reséndiz y Castrellón, 2005). Sus posibilidades únicas como técnica de caracterización en la escala nanométrica y micrométrica han sido ampliamente reconocidas en la industria de los semiconductores y del almacenamiento electrónico.

Recientemente las capacidades del MFA en el campo de los polímeros han hecho que la microscopía de fuerza atómica se revele como una técnica complementaria de otras técnicas de caracterización microscópicas y difractométricas en la caracterización morfológica, micro- y nanoestructural, así como en un gran número de aplicaciones en las que es la única técnica disponible.

Esta tecnología provee la imagen de una superficie sin que intervenga los efectos eléctricos, al medir las fuerzas mecánicas en la punta detectora, por lo que también resulta útil para materiales no conductores. Un equipo liderado por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, España) perfeccionó la técnica empleada por los microscopios atómicos. La nueva técnica, denominada Phase Imaging AFM, está basada en la microscopía de fuerzas, y permite realizar medidas tanto en aire como en medios líquidos o fisiológicos.

El desarrollo de esta técnica podría tener aplicaciones en áreas diferenciadas, como la biomedicina, la nanotecnología, la ciencia de materiales o estudios medioambientales (Ozgur *et al.*, 2007).

#### **2.4.4.1 Principales modos de operación del MFA**

En un MFA, se distinguen tres modos de operación básicos que son el modo de contacto, contacto intermitente o “tapping” y no-contacto.

Modo de contacto: La punta barre la superficie de la muestra, aplicando una fuerza constante ( $F=\text{constante}$ ) y sin levantar la punta de la superficie. La fuerza aplicada está relacionada con la deflexión que experimenta la punta mediante la constante de fuerza del cantiléver. El movimiento vertical del tubo de barrido permite obtener una imagen topográfica de la muestra que generalmente se llama Imagen de Alturas.

Modo de contacto intermitente (tapping): En el modo de contacto intermitente se aplica una señal sinusoidal, haciendo oscilar a la punta a su frecuencia de resonancia. El escáner de barrido sube y baja (en Z) para mantener esa amplitud constante en todo momento. El movimiento vertical del tubo de barrido, proporciona, de nuevo la imagen topográfica (Imagen de Alturas). Por otra parte, por efecto de la interacción de la punta con los distintos constituyentes de la muestra, se produce un cambio en la fase de la onda sinusoidal aplicada, esto es, un desfase. El registro de este desfase, permite obtener la denominada Imagen de Fase.

Modo de no-contacto: Por otra parte, cuando se trabaja en condiciones de no contacto, también se aplica una onda sinusoidal, pero sin llegar a tocar la superficie de la muestra. Es más complejo, ya que debido a la capa de contaminación de agua que recubre a todas las muestras, podría en cualquier momento pasar a tocar la muestra. Sus aplicaciones se limitan al caso de muestras muy planas (Olmos y González, 2008-2009).

La incorporación de la nanotecnología es un campo relativamente joven, por lo que ha sido necesario realizar adaptaciones a los equipos y desarrollar nuevas metodologías dirigidas al estudio del material biológico (Tapia, 2009).

Una de las ventajas del MFA es la posibilidad de visualización de células vivas *in situ*, lo que hace que sea una técnica potente y muy útil para el estudio de células (Martínez, 2014). Es capaz de generar imágenes de muestras biológicas tanto fijadas como vivas en condiciones fisiológicas. Además que proporciona imágenes tridimensionales de superficies con muy alta resolución espacial que permiten cuantificar la profundidad y morfología de las muestras en tiempo real, en el orden de los nanómetros (Martínez, 2014). La introducción de esta microscopía en estudios microbiológicos ha ayudado a los investigadores con un nuevo dispositivo para el análisis de la morfología bacteriana. Las características morfológicas específicas de la pared celular bacteriana podrían ser útiles en la identificación de factores específicos asociados a diversas enfermedades (Germano *et al.*, 2013).

Se han realizado estudios con *E. histolytica* donde se obtuvieron nano imágenes mediante el uso de Microscopio de Fuerza Atómica (MFA). La estructura del núcleo, endoplasma y ectoplasma se estudiaron por separado. En pruebas con células no infectadas y células infectadas, en etapas de trofozoítos y esquizontes, el dispositivo detectó pequeñas diferencias en las medidas de la magnitud y las diferencias aparentemente aleatorias en fase, pero no las suficientes para diferenciar definitivamente entre las etapas (Joshi *et al.*, 2000).

En el 2014 se publicó el primer reporte de la observación de células del estadio de prequiste mediante MFA. En este trabajo observaron *in situ* muestras de trofozoíto, prequiste y quiste de *E. histolytica* mediante MFA e identificaron algunas diferencias de rugosidad, elasticidad, composición y tamaño entre los diferentes estadios (Menchaca *et al.*, 2014).

Por otra parte, existen estudios utilizando varias microscopías en conjunto. Se observaron estructuras semejantes a quiste (ESQ) de *E. histolytica* que emitieron fluorescencia intensamente mediante MF en presencia de calcoflúor al 10%; en cortes semifinos vistos al Microscopio Electrónico de Transmisión (MET) las ESQ presentaron multinucleación con cromatina condensada unida a la membrana nuclear, contiene grandes vacuolas en el citoplasma y presenta una delgada pared celular. La topografía de las ESQ observadas al MEB y MFA muestra que estas estructuras quísticas están bordeadas por una cubierta de bordes irregulares (Barrón, 2007).

### 3. JUSTIFICACIÓN

*E. histolytica* es un patógeno intestinal frecuente en México, uno de los principales causantes de diarrea en menores de cinco años y la tercera causa de muerte en el mundo debida a infestación por protozoarios. Es un organismo unicelular causante de amibiasis, enfermedad parasitaria responsable de miles de muertes en México y en el mundo. Posee mecanismos patogénicos complejos que le permiten invadir la mucosa intestinal y causar colitis amebiana. La droga de elección para tratamiento y sus múltiples manifestaciones clínicas es el metronidazol y los derivados imidazólicos, sin embargo presenta efectos secundarios indeseables en el humano y además existen reportes recientes de que algunas cepas de *E. histolytica* presentan resistencia a esta droga, aunado a otros reportes que muestran actividad mutagénica, carcinogénica y neurodegenerativas. El diagnóstico específico de la infección es de importancia debido al riesgo de progresión y al potencial de transmitir la infestación, ya que no se recomienda el tratamiento a pacientes asintomáticos que estén eliminando quistes porque el uso indiscriminado de medicamentos puede provocar el riesgo de que surja resistencia del parásito. En los últimos años ha adquirido gran importancia la aplicación de antimicrobianos de origen natural, entre ellos, las bacteriocinas producidas por BAL, ya que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos. La alta incidencia de *E. histolytica* a nivel mundial y la predominancia de hospederos asintomáticos ha causado un incremento en el estudio de este parásito. Entre las técnicas de microscopía empleadas para el estudio de *E. histolytica*, se encuentra el MFA. El cual es empleado en este trabajo como herramienta que permite realizar análisis morfológicos como altura, ancho, longitud, volumen y rugosidad, tanto de los estadios de trofozoíto y quiste. Por lo tanto, los resultados obtenidos de la investigación permitirán en un futuro diseñar y establecer estrategias y/o tratamientos encaminados en el control de la amibiasis en su proceso de enquistamiento.



## **4. HIPÓTESIS**

Las bacteriocinas presentan actividad biológica sobre el enquistamiento de *E. histolytica* HM1-IMSS y los cambios morfológicos tales como altura, ancho, volumen, longitud y rugosidad pueden ser evaluados a través del Microscopio de Fuerza Atómica empleando el modo contacto o semicontacto.

## 5. OBJETIVOS

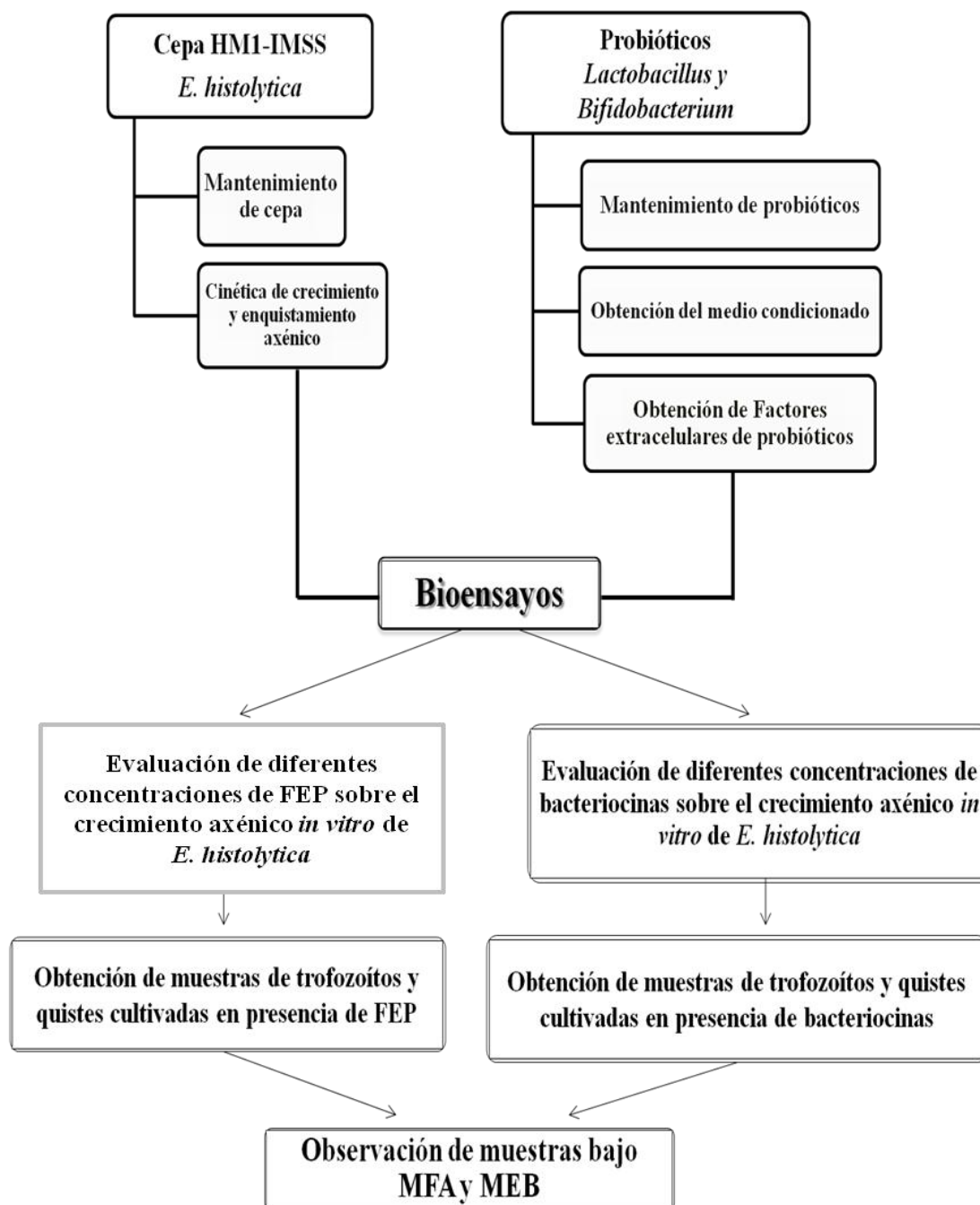
### 5.1 Objetivo general

Evaluar la actividad biológica de bacteriocinas sobre el enquistamiento de *E. histolytica* HM1-IMSS y determinar las características nanomecánicas de la superficie celular.

### 5.2 Objetivos particulares

1. Establecer la cinética de crecimiento de los microorganismos productores de bacteriocinas: *Lactobacillus casei*, *L. plantarum* y *Bifidobacterium longum*.
2. Aislar, purificar y caracterizar parcialmente las bacteriocinas producidas por *L. casei*, *L. plantarum* y *B. longum*.
3. Establecer la cinética de crecimiento de *E. histolytica* HM1-IMSS bajo condiciones axénicas *in vitro*.
4. Establecer la cinética de enquistamiento de *E. histolytica* HM1-IMSS bajo condiciones axénicas *in vitro* por el método de alta tensión de CO<sub>2</sub>.
5. Evaluar la actividad biológica de bacteriocinas sobre el estadio de trofozoíto y quiste de *E. histolytica* HM1-IMSS bajo condiciones axénicas *in vitro*.
6. Analizar trofozoítos y ESQ de *E. histolytica* HM1-IMSS cultivados en presencia de bacteriocinas y determinar los cambios morfológicos tales como rugosidad, altura, ancho, volumen y longitud a través de MFA bajo el modo semi-contacto (tapping).
7. Analizar trofozoítos de *E. histolytica* HM1-IMSS, fijados en presencia de diferentes concentraciones de glutaraldehído, a través de MFA bajo el modo contacto y/o semi-contacto (tapping).

## 6. DISEÑO EXPERIMENTAL



**Fig. 13. Diseño experimental.** Estrategia experimental para la evaluación de bacteriocinas y FEP sobre *E. histolytica* en el estadio de trofozoíto y quiste y su análisis al MFA y MEB.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1 Material biológico**

#### **Cepa de *E. histolytica*:**

En este trabajo se utilizó la cepa HM1-IMSS de *E. histolytica*, la cual se encuentra en el cepario del Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

#### **Probióticos:**

Se utilizaron los microorganismos productores de bacteriocinas: *L. casei*, *L. plantarum* y *B. longum* las cuales se encuentra en el cepario del Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

#### **Suero bovino estéril:**

Se utilizó el suero bovino adulto estéril grado CT Laboratorios Microlab S.A. de C.V.

#### **Reactivos químicos:**

Se emplearon reactivos químicos grado analítico y de casas comerciales establecidas.

## 7.2 Preparación de soluciones

En la Tabla IV se describe la preparación de reactivos.

**Tabla IV**

Preparación de reactivos empleados para el estudio de *E. histolytica*

<b>Buffer de fosfatos 0.2M, pH= 7.2</b>	<p>Se prepararon las siguientes soluciones de trabajo:</p> <p><u>Solución A:</u> Se disolvió 27.8 g de <math>K_2HPO_4</math> en 1000 mL de agua destilada.</p> <p><u>Solución B:</u> Se disolvió 53.65 g de <math>KH_2PO_4</math> en 1000 mL de agua destilada.</p> <p>Se mezcló 28 mL de la solución A con 72 mL de la solución B para obtener un volumen final de 100 mL y un pH de 7.2. Posteriormente se esterilizó la solución.</p>
<b>Buffer de carga 2x</b>	Se mezcló Tris-HCl 90 mM pH 6.8, SDS 2.0%, Glicerol 20.0% (v/v) y Azul de bromofenol 0.02%.
<b>Buffer de carga 6x</b>	Se mezcló Tris-HCl 375 mM pH 6.8, SDS 6%, Glicerol 48% (v/v), $\beta$ -mercaptoetanol 5% y Azul de bromofenol 0.03%.
<b>Glutaraldehído al 2.5%</b>	Se disolvió 10 mL de glutaraldehído al 25% en 90 mL de buffer de fosfatos 0.2M, pH 7.2 para obtener una solución final al 2.5%.
<b>SDS al 0.5%</b>	Se pesaron 2.5 g de SDS y se aforó en un matraz volumétrico a 500 mL empleando agua purificada.
<b>Solución decolorante</b>	Se mezclaron 250 mL de metanol, 100 mL de ácido acético, 20 mL de glicerol y se aforó con agua a 1 L.
<b>Solución de metronidazol</b>	Se disolvió 0.1 g de metronidazol en 1 mL de agua desionizada estéril pH 7.
<b>Solución de penicilina-estreptomicina-suero</b>	<p><u>Solución concentrada de penicilina:</u> A un frasco de penicilina G sódica cristalina se le agregó agua bidestilada-desionizada estéril para disolver la penicilina.</p> <p><u>Solución patrón de penicilina-estreptomicina:</u> En un cónico estéril se pesó 1 g de estreptomicina y bajo condiciones de esterilidad se añadió la solución concentrada de penicilina y se aforó con agua bidestilada desionizada estéril pH 7 a 20 mL.</p> <p><u>Solución patrón de penicilina-estreptomicina-suero:</u> En cónicos estériles se colocó 36 mL de suero bovino estéril descomplementado y 4 mL de la solución patrón de penicilina-estreptomicina.</p>
<b>Solución de tinción:</b>	Se mezclaron 250 mL de metanol, 100 mL de ácido acético, 20 mL de glicerol, 0.25% Azul de Coomassie G-250 y se aforó con agua a 1 L.
<b>Tritón X-100 al 1%:</b>	Se disolvió 0.5 mL de Tritón X-100 en agua purificada y se aforó a 50 mL.

### 7.3 Preparación del medio de cultivo

Se mezclaron los componentes para preparar el medio MPT, (los cuales por motivo de registro de patente no se agregan las especificaciones en este escrito) y se aforó con agua desionizada a 500 mL y se ajustó el medio a pH 7. En tubos de borosilicato de 13x150 mm se vertieron 5 mL de medio MPT y se procedió a esterilizar los tubos a 121 °C/15 Lb durante 20 min (según especificaciones de All American Model 25X-1). Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se les realizó prueba de esterilidad al incubarlos por 37 °C/24 h, una vez que se corroboró la esterilidad de los medios preparados, se almacenaron a congelación hasta su empleo.

### 7.4 Metodología

#### 7.4.1 *Entamoeba histolytica*

**7.4.1.1 Mantenimiento:** La cepa se mantuvo mediante resiembras sucesivas inoculando  $2 \times 10^4$  trofozoítos/mL a tubos de borosilicato de 13x150 mm que contenía 5 mL de medio MPT adicionado con 0.55 mL de solución penicilina-estreptomicina-suero. La cepa se incubó a 37 °C por 72 h. Antes de cada resiembra los cultivos se observaron en un microscopio invertido para comprobar el buen estado de las amibas. El cultivo que mostró la mejor densidad y el mejor aspecto se colocó en un baño agua-hielo por 20 min. Para despegar las células adheridas al tubo, éste se agitó por inversión suave y el número de trofozoítos se determinó tomando una alícuota del cultivo y se colocó en una cámara de Neubauer para el conteo de trofozoítos/mL. Las resiembras y bioensayos se realizaron cuando las células se encontraron en la mitad de su fase logarítmica de crecimiento.

**7.4.1.2 Cinética de crecimiento bajo condiciones axénicas *in vitro*:** Se inocularon 21 tubos de borosilicato de 13x150 mm con tapón de rosca, que contenía 5 mL de medio MPT adicionado con 0.55 mL de solución penicilina-estreptomicina-suero y un inóculo de  $1 \times 10^4$  trofozoítos/mL. Se incubaron a 37 °C y cada 24 h se determinó el número de trofozoítos/mL a tres tubos del

cultivo hasta el séptimo día de incubación. Se realizaron tres lecturas a cada tubo y el conteo de trofozoítos/mL se realizó en cámaras de Neubauer. Posteriormente los resultados se graficaron.

**7.4.1.3 Cinética de enquistamiento bajo condiciones axénicas *in vitro*:** A 28 tubos de borosilicato de 13x150 mm se les realizó un baño de agua-hielo por 20 min para despegar las células. Se inocularon 6 matraces de 50 mL que contenían 20 mL de medio MPT adicionado con 2 mL de solución penicilina-estreptomicina-suero y un inóculo de  $2 \times 10^4$  trofozoítos/mL que se encontraban en fase logarítmica de crecimiento. Posteriormente, a cada matraz se gaseó CO<sub>2</sub> a saturación con pipetas Pasteur estériles. Se incubaron a 37 °C durante 7 días y a partir del cuarto día se determinó el número de estructuras semejantes a quiste (ESQ) hasta el séptimo día de incubación. Cada 24 h se tomaron las células de 4 tubos mediante un enfriamiento en agua-hielo a 4 °C por 20 min para despegar las células. Se vaciaron a tubos cónicos de 50 mL y se centrifugó a 4,000 rpm por 5 min, se hizo el conteo de células totales en cámara de Neubauer; enseguida se agregó detergente tritón X-100 al 1% por 30 min, y nuevamente se centrifugó a 4,000 rpm por 5 min y se determinó las estructuras resistentes mediante un conteo en cámara de Neubauer (Barrón *et al.*, 2008).

## **7.4.2 Probióticos**

**7.4.2.1 Mantenimiento:** Cada cultivo de *L. casei*, *L. plantarum* y *B. longum* se mantuvo en refrigeración a 4 °C en medio MPT para probióticos. La reactivación de cada cepa se realizó tomando 50 µL y se inocularon en tubos de borosilicato de 13x150 mm que contenía 5 mL de medio MPT para probióticos y se incubaron de 24-48 h a 37 °C.

**7.4.2.2 Cinética de crecimiento por método de turbidimetría:** Frente al mechero se inocularon por separado 60 µL de *L. casei*, *L. plantarum* y

*B. longum* en nueve tubos de borosilicato de 13x150 mm que contenía 5 mL de medio MPT para probióticos, ajustando la absorbancia a 0.1.

Posteriormente, se incubaron a 37 °C y cada hora se realizaron las lecturas de absorbancia empleando un espectrofotómetro (SPECTRONIC® GENESYS 5) a una longitud de onda de 635 nm. Se registraron los datos y se graficó.

**7.4.2.3 Obtención de factores extracelulares de probióticos (FEP):** A partir de cada cepa de probióticos, reactivada previamente durante 24 h, se realizaron frente al mechero 3 resiembras sucesivas, dos de ellas en tubos de borosilicato de 13x150 mm que contenía 5 mL de medio MPT para probióticos y en la última resiembra se transfirió el contenido del tubo de la resiembra anterior a un matraz que contenía 500 mL de medio MPT para probióticos. Se incubó a 37 °C por 24 h.

Posteriormente, frente al mechero, el contenido de los matraces se colocó en tubos cónicos estériles de 50 mL y se centrifugó a 2500 rpm por 20 min y se recuperó el sobrenadante en matraces estériles de 500 mL. En condiciones de esterilidad el material recuperado se filtró utilizando envases Millipore (0.22µm, GP Millipore Express ®PLUS Membrane, Massachusetts, USA).

Se realizó una prueba de esterilidad tomando una alícuota del filtrado, se agregó en medio MPT y se incubó a 37 °C por 24 h. El sobrenadante filtrado se almacenó a 4 °C hasta el momento de liofilizar. Se recuperó el liofilizado en tubos cónicos de 50 mL estériles y se almacenó a 4 °C hasta el momento de su uso.

#### **7.4.3 Bioensayo de FEP sobre *E. histolytica* bajo condiciones axénicas *in vitro***

**7.4.3.1 Evaluación de FEP sobre el crecimiento y enquistamiento de *E. histolytica*:** En 30 tubos de borosilicato de 13x150 mm que contenían 5 mL de medio MPT adicionado con 0.55 mL de solución penicilina-estreptomicina-suero se inocularon  $1 \times 10^4$  trofozoítos/mL y se agregaron diferentes



concentraciones a evaluar (0.1, 1, 10 y 50 mg/mL) del liofilizado de los factores extracelulares de cada probiótico. Se incubaron a 37 °C por 72 h.

Posteriormente, los tubos se colocaron en un baño de agua-hielo durante 20 min, se agitaron y se tomaron alícuotas para determinar el número de trofozoítos/mL empleando cámaras de Neubauer. Se realizó en tres eventos independientes por triplicado. Se registraron los datos y se graficaron.

Para el enquistamiento se realizó la misma metodología en matraces de 50 mL que se gasearon a saturación con CO<sub>2</sub> antes de incubarse y a partir del cuarto día se determinó el número de estructuras semejantes a quistes (ESQ) empleando cámaras de Neubauer. Se realizó en tres eventos independientes por triplicado. Se registraron los datos y se graficaron.

**7.4.3.2 Obtención de muestra de trofozoítos y ESQ en presencia de FEP para análisis a microscopía:** En los tubos de borosilicato de 13x150 mm, que contenían trofozoítos cultivados en presencia de FEP, se colocó cubreobjetos de 5 mm de lado por lado y se dejaron incubar a 37 °C por 72 h. Posteriormente, se extrajo el cubreobjetos con mucho cuidado para cubrirlo con glutaraldehído al 2.5% temperado a 37 °C y se adhirió el cubreobjetos con cinta doble cara sobre el portamuestras especial para microscopía de fuerza atómica. Se observaron las muestras de trofozoítos cultivados en presencia de FEP mediante MFA (Atomic Force Microscope Ntegra Prima NT-MDT) por el modo semi-comtacto. Mientras que los trofozoítos controles sin tratamientos se observaron con un MFA diferente (Oxford Instruments Asylum Research MFP-3D Classic) mediante el modo contacto. Se fotodocumentó y se analizó.

Para la obtención de muestras de ESQ cultivados en presencia de FEP, a partir del día 4 se tomaron los matraces y se colocaron en un baño de agua-hielo durante 20 min. Posteriormente, se agitaron, se vació el contenido en tubos cónicos de 50 mL y se centrifugó a 4,000 rpm durante 5 min. Se eliminó el

sobrenadante, se agregó 1 mL de detergente Tritón X-100 y se dejó reposar durante 30 min. Enseguida se centrifugó a 4,000 rpm durante 10 min.

Se retiró el sobrenadante y se hicieron 3 lavados con agua purificada centrifugando a 4,000 rpm durante 5 min cada uno. Se recuperó la pastilla en un eppendorf estéril y se incubó a 37 °C durante 20 min. Posteriormente, se agregó glutaraldehído temperado y se dejó reposar 1 h. Se colocó una gota de muestra en cubreobjetos estériles y se adhirió el cubreobjetos con cinta doble cara sobre el portamuestras especial para MFA. Se observaron las muestras al MFA (Atomic Force Microscope Ntegra Prima NT-MDT) empleando el modo semi-contacto (tapping). Se fotodocumentó y se analizó.

Para el análisis al Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) se realizó la misma metodología para la obtención de muestras de trofozoítos y ESQ. Se fotodocumentó y se analizó. Para el análisis a Microscopía de Fluorescencia (MF) se realizó la misma metodología para la obtención de muestras de ESQ. Se colocó una gota de muestra en un portaobjetos y se añadió una gota de calcoflúor. Se fotodocumentó y se analizó.

#### **7.4.4 Obtención de proteínas a partir de FEP**

##### **7.4.4.1 Determinación cualitativa de proteínas mediante Prueba de Biuret:**

A los factores extracelulares de probióticos obtenidos de cada cepa se detectó la presencia o ausencia de proteínas. En una placa de porcelana se agregaron 5 gotas de FEP y se adicionó una gota del reactivo de Biuret considerando como prueba positiva (presencia de proteínas) al color violeta y una prueba negativa (ausencia de proteínas) al color azul del reactivo.

**7.4.4.2 Obtención de bacteriocinas por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ :** En un matraz se colocó 250 mL de cada uno de los factores extracelulares de los probióticos y se agregaron 140.26 g de sulfato de amonio para tener una

saturación del 80%. El matraz se dejó en agitación por 24 h a 4°C en un baño con hielo. Posteriormente, el contenido de los matraces se vació en cónicos de 50 mL para centrifugar a 2,547 rpm durante una hora.

Por decantación se eliminó el sobrenadante y el precipitado de proteínas con sulfato de amonio se resuspendió con buffer de fosfatos 0.2 M a un pH 7.2.

Para cada uno de los precipitados de proteínas resuspendidos se realizó una diálisis usando 10 cm de longitud de membrana (spectra por membrane tubing) humedecidas con agua bidestilada y se ató por un extremo. En el interior de la membrana se agregó 10 mL de solución de proteína resuspendida y se ató el extremo faltante. Posteriormente la membrana de diálisis se introdujo en un matraz erlenmeyer de 500 mL que contenía agua bidestilada y se dejó en agitación por 24 h a 4 °C con cambios de agua bidestilada cada 6 h. Terminada la diálisis, se extrajo la membrana del interior del matraz y el contenido se almacenó en cónicos de 50 mL. Al dializado se le realizó una prueba de Biuret, antes descrito. Después de obtener una prueba positiva, se colocó el dializado en frascos para liofilizador (Labconco corporation, Kansas City, Missouri. 64132) para liofilizar el material y se recuperó el liofilizado en cónicos de 50 mL estériles y se almacenó a 4 °C hasta el momento del bioensayo.

#### **7.4.4.3 Caracterización de bacteriocinas por la técnica de electroforesis:**

**Preparación de la muestra:** Las muestras se mezclaron con el respectivo buffer de carga (Tabla V), se pusieron en ebullición durante 5 min, se añadió  $\beta$ -mercaptoetanol al 5%, posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm y se colocaron en el gel (Tabla VI), se utilizó un gel de poliacrilamida 4-20% criterion de bio-rad, se corrió a 300 volts durante 30 min utilizando buffer de corrimiento tris glicina.

**Tabla V**

Lista de muestras de bacteriocinas analizadas por electroforesis

Muestra	Peso/volumen (mg/ L)	Buffer de carga 2x	Buffer de carga 6x
LLp	8.2 mg	100 µL	--
LLc	8.2 mg	100 µL	--
MLp	100 µL	--	20 µL
MLc	100 µL	--	20 µL
BacLp	100 µL	--	20 µL
BacLc	100 µL	--	20 µL

LLp.- Liofilizado de bacteriocinas de *L. plantarum*.

LLc.- Liofilizado de bacteriocinas de *L. casei*.

MLp.- Metabolitos de *L. plantarum*.

MLc.- Metabolitos de *L. casei*.

BacLp.- Cultivo de *L. plantarum*.

BacLc.- Cultivo de *L. casei*.

**Tabla VI**

Distribución de las muestras en el gel de poliacrilamida

Gel-1			Gel-2	
Carril	Muestra	Volumen depositado (µl)	Muestra	Volumen depositado (µl)
1	Sin muestra	-	Sin muestra	-
2	Marcador	3	Marcador	3
3	Sin muestra	-	Sin muestra	-
4	BacLp	8	BacLc	8
5	Sin muestra	-	Sin muestra	-
6	LLp	8	LLc	8
7	Sin muestra	-	Sin muestra	-
8	MLp	8	MLc	8 µL
9	Sin muestra	-	Sin muestra	-

LLp.- Liofilizado de bacteriocinas de *L. plantarum*.

LLc.- Liofilizado de bacteriocinas de *L. casei*.

MLp.- Metabolitos de *L. plantarum*.

MLc.- Metabolitos de *L. casei*.

BacLp.- Cultivo de *L. plantarum*.

BacLc.- Cultivo de *L. casei*.

**Tinción y decoloración del gel:** Al término de la electroforesis, el gel de poliacrilamida se colocó en un recipiente para teñirlo con la solución de Azul de Coomassie en un volumen que cubrió completamente el gel. Se dejó incubar por 15-20 min en un aparato orbital para generar movimientos rotatorios. Posteriormente el gel de poliacrilamida teñido se colocó en un recipiente y se adicionó la solución preparada para decolorar el gel, en un volumen que lo cubrió completamente. Se dejó incubar por 30 min en un aparato orbital para generar movimientos rotatorios. Pasado el tiempo de incubación, se eliminó la solución y se observó en un transiluminador (UVP™ High-Performance UV Transilluminators).

#### **7.4.5 Bioensayo de bacteriocinas sobre *E. histolytica***

**7.4.5.1 Evaluación de bacteriocinas sobre crecimiento y enquistamiento de *E. histolytica*:** En 30 tubos de borosilicato de 13x150 mm que contenían 5 mL de medio MPT adicionado con 0.55 mL de solución penicilina-estreptomicina-suero se inocularon  $1 \times 10^4$  trofozoítos/mL y se agregaron diferentes concentraciones a evaluar (0.1, 0.3 y 0.5 mg/mL) del liofilizado de bacteriocinas de cada probiótico. Se incubaron a 37 °C por 72 h. Posteriormente, los tubos se colocaron en un baño de agua-hielo durante 20 min, se agitaron y se tomaron alícuotas para determinar el número de trofozoítos/mL empleando cámaras de Neubauer. Se realizó en tres eventos independientes. Se registró los datos y se graficaron.

Para el enquistamiento se realizó la misma metodología en matraces de 50 mL que se gasearon con CO<sub>2</sub> antes de incubarse y a partir del cuarto día se determinó el número de ESQ empleando cámaras de Neubauer. Se realizó en tres eventos independientes. Se registraron los datos y se graficaron.

**7.4.5.2 Obtención de muestra de trofozoítos y ESQ en presencia de bacteriocinas para análisis a microscopía:** En los tubos de borosilicato de 13x150 mm, que contenían trofozoítos cultivados en presencia de bacteriocinas, se colocó cubreobjetos de 5 mm de lado por lado y se dejaron incubar a 37 °C por 72 h. Posteriormente, se extrajo el cubreobjetos con mucho cuidado para cubrirlo con glutaraldehído al 2.5% temperado a 37 °C y se adhirió el cubreobjetos con cinta doble cara sobre el portamuestras especial para MFA.

Se observó la muestra de trofozoítos controles mediante un MFA (Oxford Instruments Asylum Research MFP-3D Classic) empleando el modo contacto. Mientras que los trofozoítos en presencia de los tratamientos se observaron mediante un Microscopio de Fuerza Atómica-Ntegra Prima NT-MDT bajo el modo semi-contacto. Se fotodocumentó y se analizó.

Por otra parte para la obtención de muestras de ESQ cultivados en presencia de bacteriocinas, a partir del cuarto día se tomaron los matraces y se colocaron en un baño de agua-hielo durante 20 min.

Posteriormente, se agitaron, se transfirió el contenido en tubos cónicos de 50 mL y se centrifugó a 4,000 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante, se agregó 1 mL de detergente Tritón X-100 y se dejó reposar durante 30 min. Enseguida se centrifugó a 4,000 rpm durante 10 min. Se retiró el sobrenadante y se hicieron 3 lavados con agua purificada centrifugando a 4,000 rpm durante 5 min cada uno. Se recuperó la pastilla en un eppendorft estéril y se incubó a 37 °C durante 20 min. A la pastilla en el eppendorft se le agregó glutaraldehído temperado y se dejó reposar 1 h. Se colocó una gota de muestra en cubreobjetos estériles y se adhirió el cubreobjetos con cinta doble cara sobre el portamuestras especial para microscopía de fuerza atómica. Se observaron las muestras empleando el Atomic Force Microscope Ntegra Prima NT-MDT mediante el modo semi-contacto (tapping). Se fotodocumentó y se analizó (Fig. 14).

Para el análisis al MEB se realizó la misma metodología para la obtención de muestras de trofozoítos y ESQ. Se fotodocumentó y se analizó. Para el análisis a MF se realizó la misma metodología para la obtención de muestras de ESQ. Se colocó una gota de muestra en un portaobjetos y se añadió una gota de calcoflúor. Se fotodocumentó y se analizó.



**Fig. 14. Análisis al MFA.** Observación de muestras de trofozoítos y ESQ empleando el modo semi-contacto (tapping).

#### **7.4.6 Obtención de muestra de trofozoítos fijados a diferentes concentraciones de glutaraldehído**

En tubos de borosilicato de 13x150 mm que contenían 5 mL de medio MPT adicionado con 0.55 mL de solución penicilina-estreptomicina-suero se inocularon  $1 \times 10^4$  trofozoítos/mL y se colocaron cubreobjetos de 5 mm de lado por lado y se dejaron incubara 37 °C por 72 h. Posteriormente, se extrajeron los cubreobjetos con mucho cuidado para cubrir unos con glutaraldehído al 0.05 y otros con 2.5% temperado a 37 °C mientras que otros se dejaron secar a temperatura ambiente sin glutaraldehído.

#### **7.4.7 Análisis estadístico**

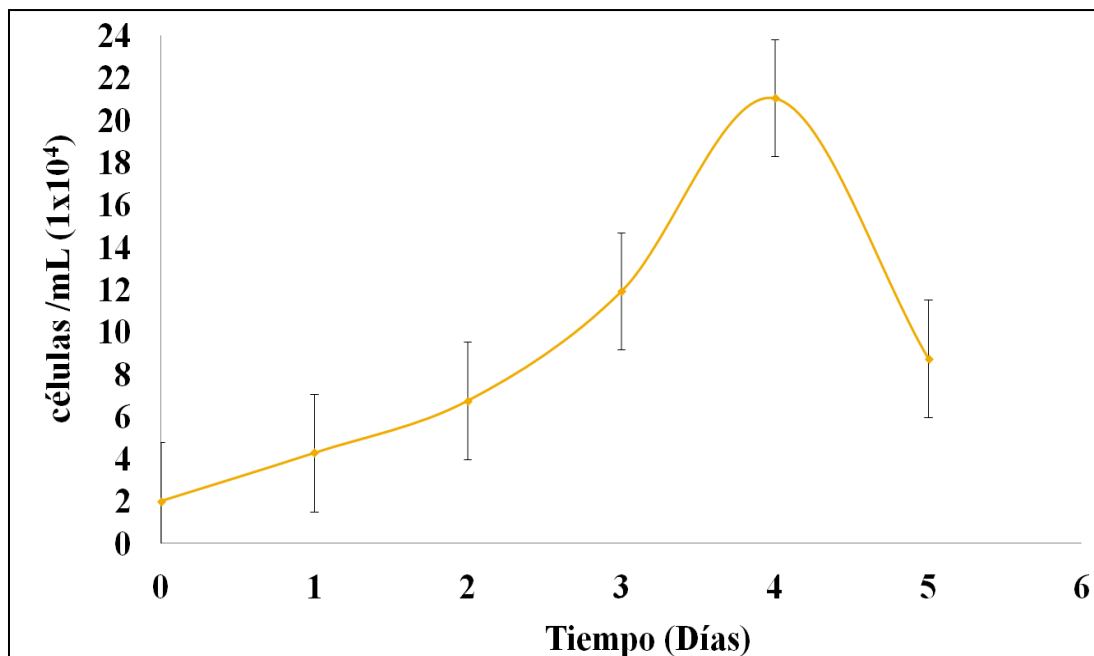
Con los resultados obtenidos se utilizó un diseño experimental estadístico completamente al azar en donde los datos de cuantificación se sometieron a un Análisis de Varianza (ANOVA) mediante el paquete de software estadístico SPSS versión 17.0, para determinar si existe diferencia significativa entre los métodos utilizados ( $P < 0.05$ ), seguido por la prueba de comparación múltiple de Tuckey con un nivel de significancia menor al 5% para los análisis realizados.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 *Entamoeba histolytica*

#### 8.1.1 Cinética de crecimiento

La cinética de crecimiento de *E. histolytica* (Fig. 15) se realizó empleando el medio de cultivo MPT bajo condiciones axénicas *in vitro*. Se realizaron lecturas en cámaras Neubauer cada 24 h durante 6 días y se observó que durante las primeras 48 h se presentó una ligera fase de adaptación. Posteriormente se observó una fase logarítmica, alcanzando su rendimiento máximo a las 96 h y con un rendimiento de aproximadamente 200,000 cel/mL y después se observó la fase de muerte donde se aprecia una disminución paulatina en el número de células.

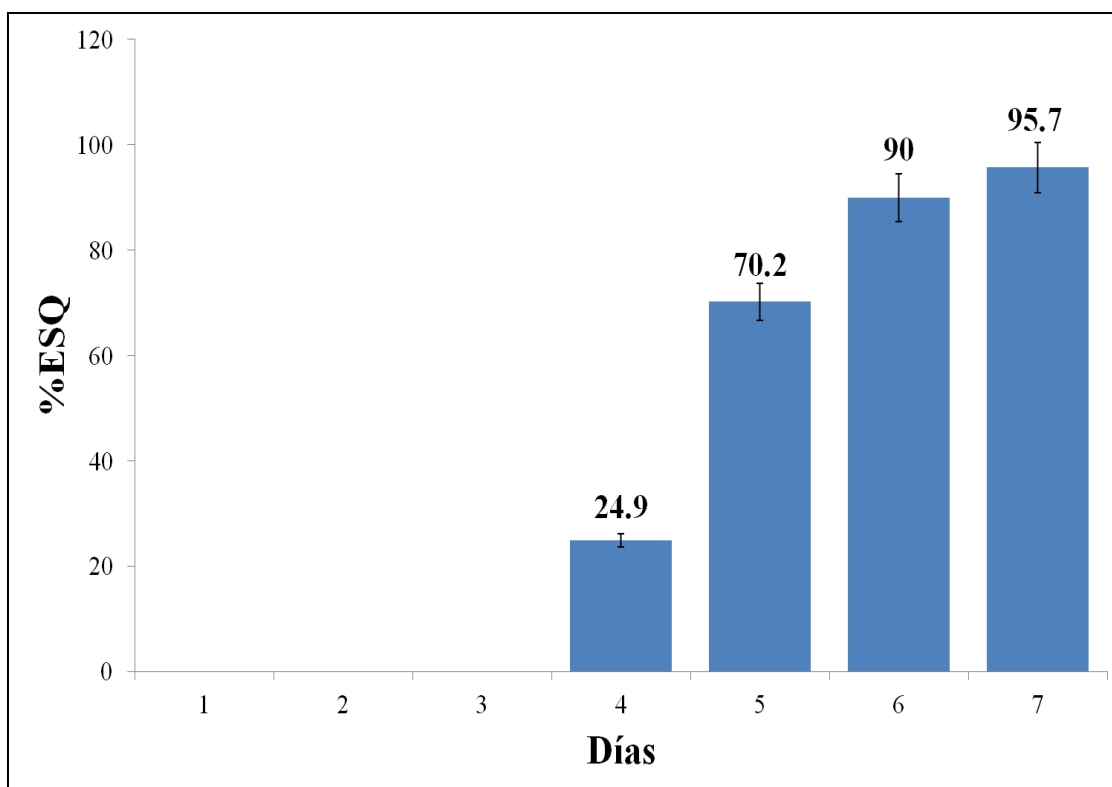


**Fig. 15.** Cinética de crecimiento de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas *in vitro*. Esta cinética fue realizada empleando el medio MPT. Los resultados obtenidos mostraron un rendimiento de aproximadamente 200,000 cel/mL que son el resultado de tres eventos independientes por triplicado.



### 8.1.2 Cinética de enquistamiento

Se llevó a cabo la inducción de ESQ de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas *in vitro*. Se realizaron lecturas en cámaras Neubauer cada 24 h durante 7 días, los resultados se presentan en la Fig. 16. Durante los primeros 3 días de incubación a 37 °C se observa una ausencia de ESQ; sin embargo a partir del día 4 de incubación comienzan a formarse dichas estructuras obteniendo un 24.9% de ESQ resistentes a detergente Tritón X-100 al 1%. Al día 5 de incubación se obtuvo un 70.2%, en el día 6 se obtuvo un 90% y al día 7 se obtuvo un máximo rendimiento de 95.7% de ESQ resistentes a detergente. En los días 6 y 7 se observó diferencia significativa entre sí pero con respecto al rendimiento obtenido en los días 4 y 5 se observa una mayor diferencia significativa.

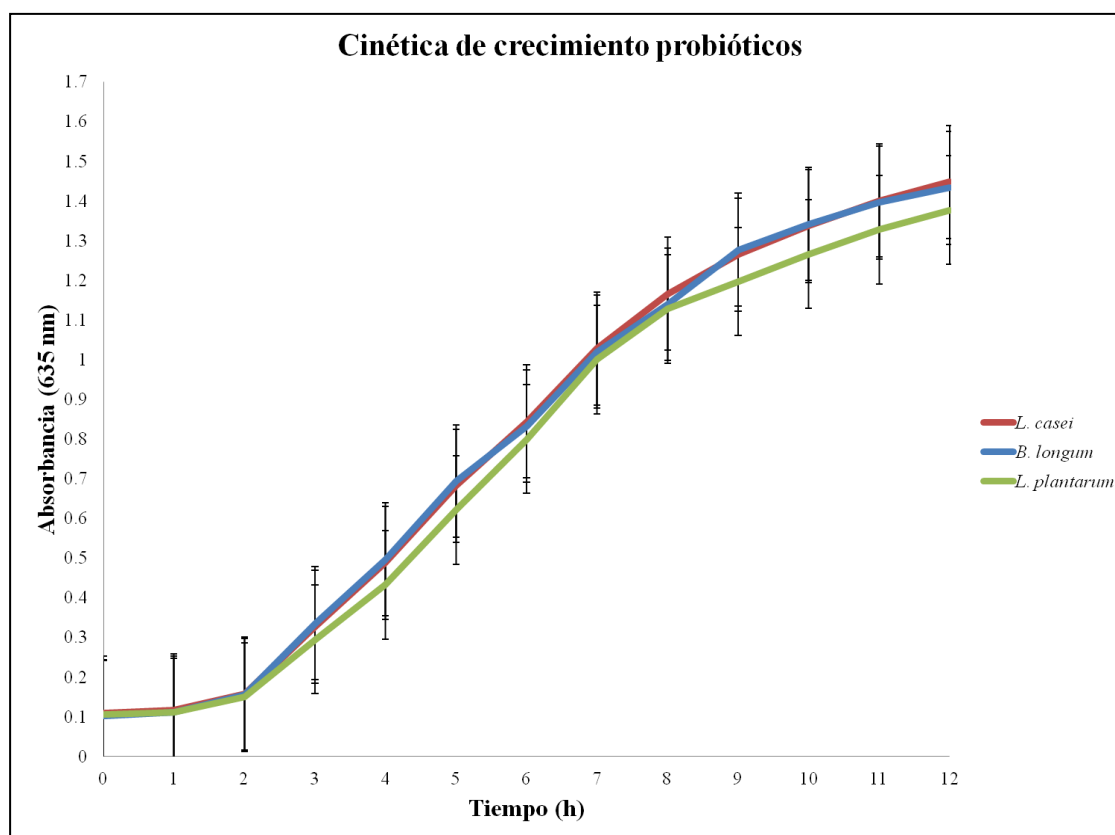


**Fig. 16. Cinética de enquistamiento de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas *in vitro*.** Esta cinética fue realizada empleando el medio MPT y utilizando el método de alta tensión de CO<sub>2</sub>. Los resultados obtenidos mostraron un máximo rendimiento de 95.7% de ESQ resistentes a detergente a los 7 días, son el resultado de tres eventos independientes por triplicado.

## 8.2 Probióticos: *Lactobacillus casei*, *L. plantarum* y *Bifidobacterium longum*

### 8.2.1 Cinética de crecimiento

En las cinéticas de crecimiento de *L. casei*, *L. plantarum* y *B. longum* en el medio de cultivo MPT para probióticos se observa una fase de adaptación durante las primeras dos horas de incubación. Posteriormente entre la hora 2 a 8 se presenta una fase de crecimiento logarítmico, y durante las siguientes horas alcanzando una máxima absorbancia de 1.5 nm a las 12 h de incubación, no se observa diferencia significativa entre el rendimiento de los cultivos bacterianos (Fig. 17).



**Fig. 17.** Cinética de crecimiento de probióticos (*L. casei*, *L. plantarum* y *B. longum*). Esta cinética fue realizada empleando el medio MPT para probióticos. Cada punto representa el promedio de la lectura en tres eventos independientes por triplicado.

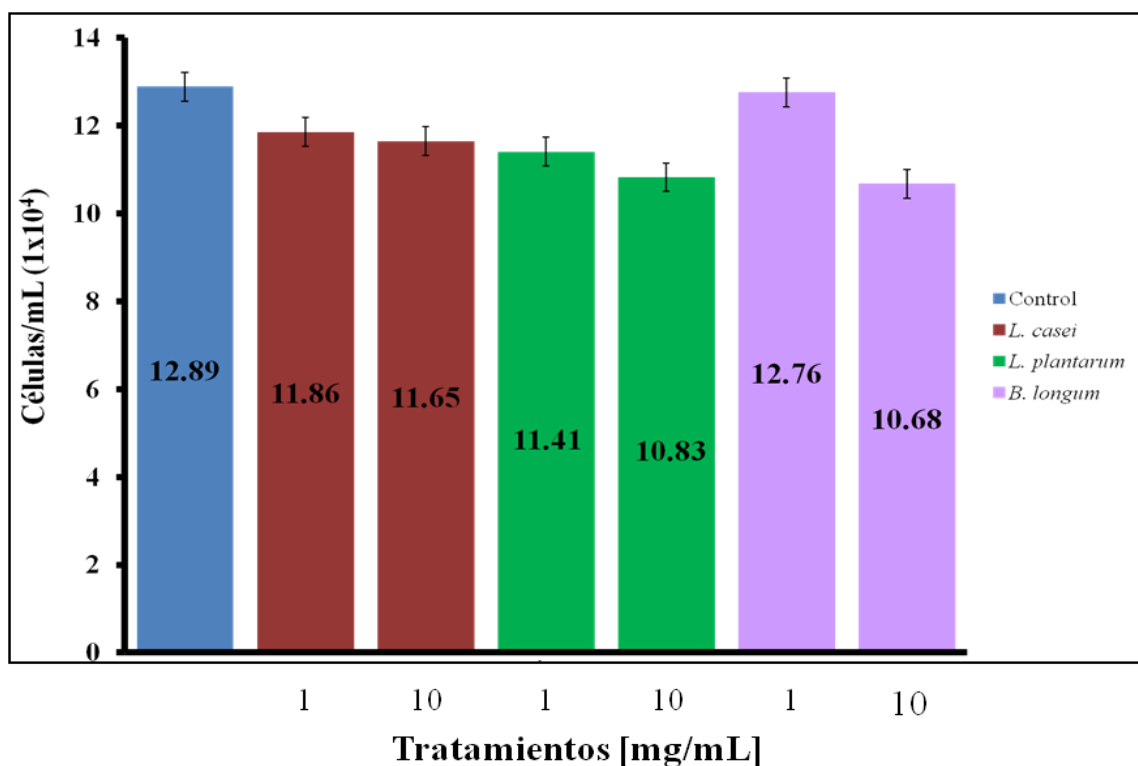
### **8.3. Bioensayos de Factores Extracelulares de Probióticos (FEP) sobre *E. histolytica***

#### **8.3.1 Actividad biológica de FEP sobre trofozoítos y ESQ de *E. histolytica***

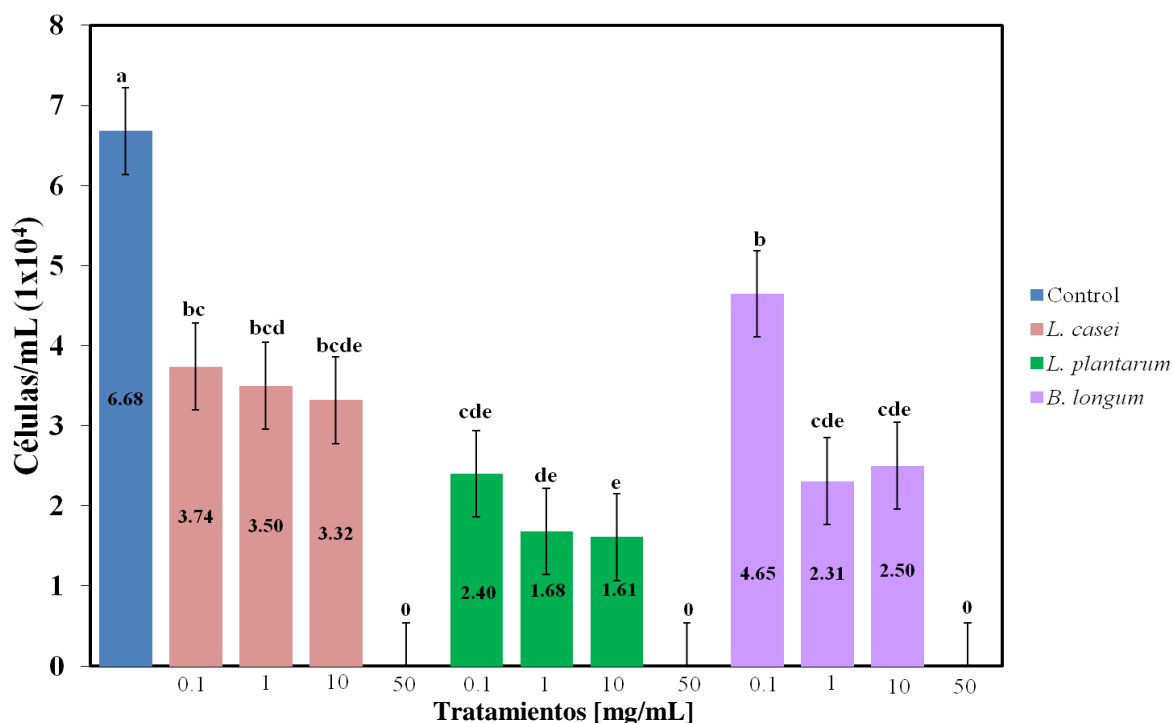
Se obtuvieron los factores extracelulares de cada probiótico para evaluarse a diferentes concentraciones tanto en la fase de trofozoíto como de ESQ. En las figuras 18 y 19 se muestran los rendimientos celulares de trofozoítos y ESQ obtenidos del bioensayo realizado respectivamente.

En la figura 18 se muestra, de acuerdo al análisis estadístico mediante un análisis de varianza y una comparación de medias (anexo I), que no existe diferencia significativa entre los diferentes tratamientos. Sin embargo, el tratamiento que presentó mayor inhibición de trofozoítos con respecto al control fue *B. longum* a 10 mg/mL.

En la figura 19 se muestra que todos los tratamientos presentan inhibición de ESQ. Además de que existe alta diferencia significativa entre los tratamientos. El análisis estadístico mediante una comparación de medias (anexo I) mostró que existen cinco grupos diferentes, los cuales se muestran con letra en el gráfico. El tratamiento que presentó mayor inhibición de ESQ fue el FE de *L. plantarum* a 10 mg/mL con respecto a todos los demás tratamientos.



**Fig. 18. Rendimiento celular de trofozoítos de *E. histolytica* en presencia de FEP.** Comparación del rendimiento celular de trofozoítos cultivados en presencia de liofilizado de FE de *L. casei*, *L. plantarum* y *B. longum* a las concentraciones de 1 y 10 mg/mL.

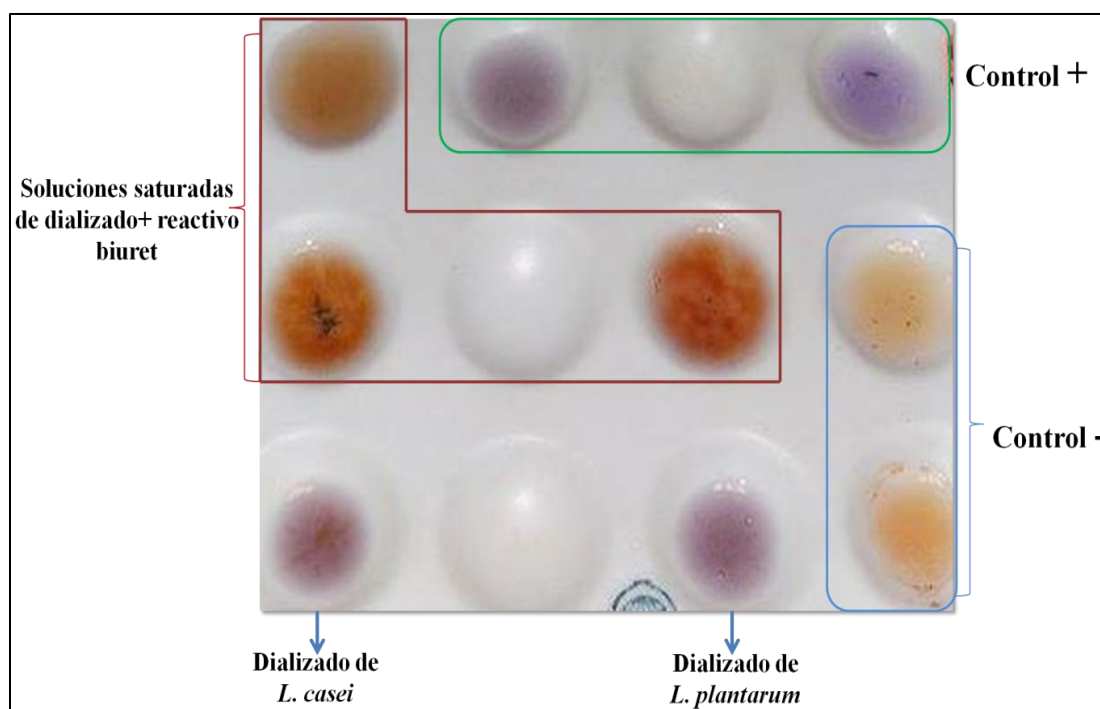


**Fig. 19. Rendimiento celular de ESQ de *E. histolytica* en presencia de FEP.** Comparación del rendimiento celular de ESQ cultivados en presencia de liofilizado de FE de *L. casei*, *L. plantarum* y *B. longum* a las concentraciones de 0.1, 1, 10 y 50 mg/mL.

## 8.4 Bacteriocinas

### 8.4.1 Determinación cualitativa de proteínas

Previo a la obtención de los liofilizados de las bacteriocinas de cada probiótico, se realizó la determinación cualitativa de proteínas mediante una prueba de Biuret al dializado. En la figura 20 se muestra la placa de porcelana con las diferentes tonalidades de las reacciones, las cuales indicaron una reacción positiva (color violeta), es decir, se observó presencia de proteínas. Se observan reacciones positivas en los dializados de *L. plantarum* y *L. casei*.



**Fig. 20. Reacción de Prueba de Biuret.** Determinación cualitativa de proteínas a los dializados de *L. casei* y *L. plantarum* mediante la prueba de Biuret. Control + (Suero bovino adulto) y Control - (Medio MPT).

### 8.4.2 Cuantificación de proteínas según normativa

A los medios condicionados se les determinó el contenido de proteínas totales y ácidos grasos totales mediante las normas mexicanas: NMX-F-608-NORMEX-2002 (determinación de proteínas) y NOM-086-SSA1-1994 (determinación de grasas). En la figura 21 se muestra un gráfico comparativo del contenido porcentual de proteínas y grasas presentes en el medio MPT y en los medios condicionados de *L. plantarum* y *L. casei*. Se observó que el porcentaje de proteínas es muy similar entre ellos.

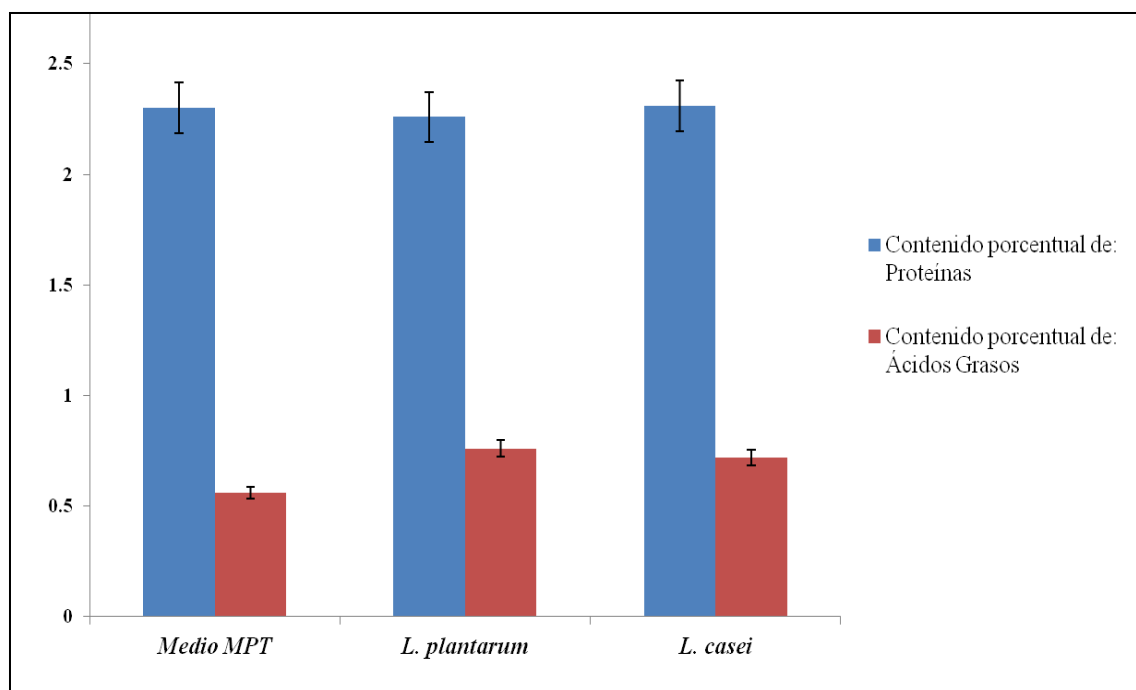
Por el contrario, el contenido de grasa es mayor en los medios condicionados de *L. plantarum* y *L. casei* que en el medio MPT. El medio condicionado de *L. plantarum* presenta el menor contenido de proteínas con 2.26%, pero por el contrario mostró el mayor contenido de grasas con un 0.76% (Tabla VII).

**Tabla VII**  
Análisis fisicoquímicos de los medios condicionados

Bacteria ácido láctica	Contenido de	
	Proteína* (%)	Grasa <sup>√</sup> (%)
Control (MPT)	2.30	0.56
<i>L. plantarum</i>	2.26	0.76
<i>L. casei</i>	2.31	0.72

\*NMX-F-608-NORMEX-2002

<sup>√</sup>NOM-086-SSA1-1994

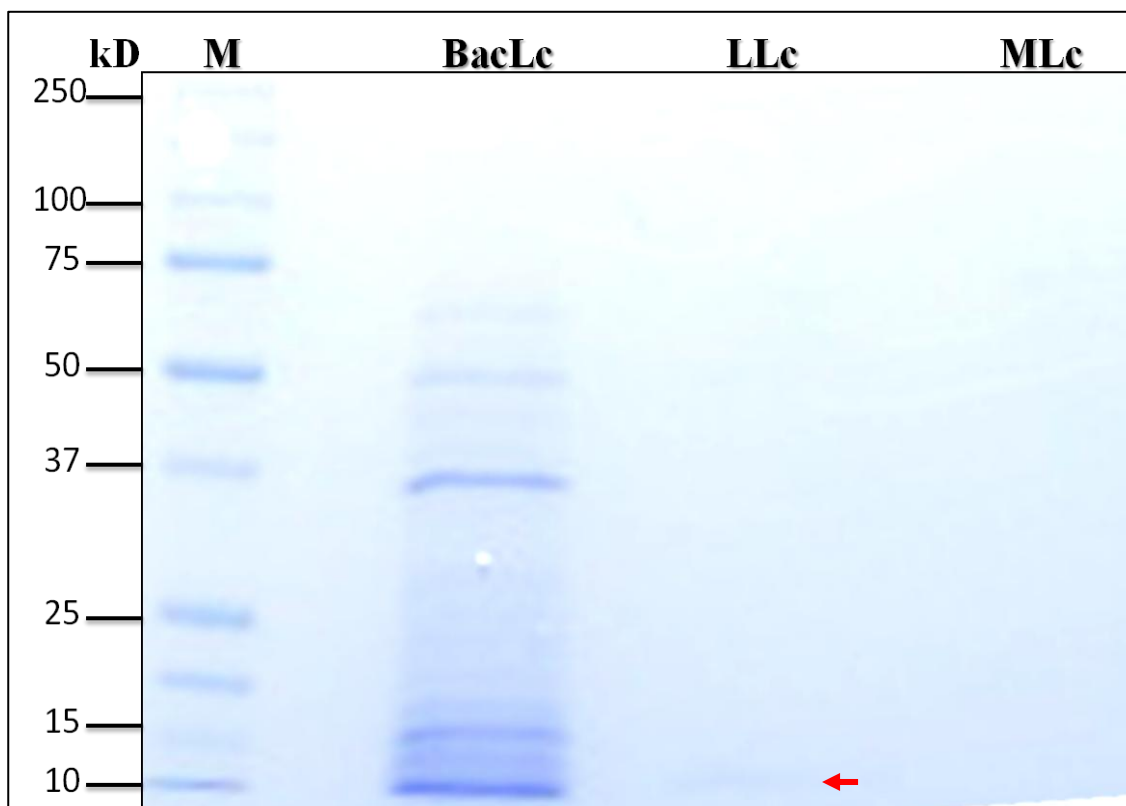


**Fig. 21. Cuantificación de proteínas y ácidos grasos.** Comparativo del contenido porcentual de proteínas y ácidos grasos de bacterias ácido lácticas (*L. casei* y *L. plantarum*) mediante las normas NMX-F-608-NORMEX-2002 y NOM-086-SSA1-1994

#### 8.4.3 Caracterización parcial de bacteriocinas de probióticos

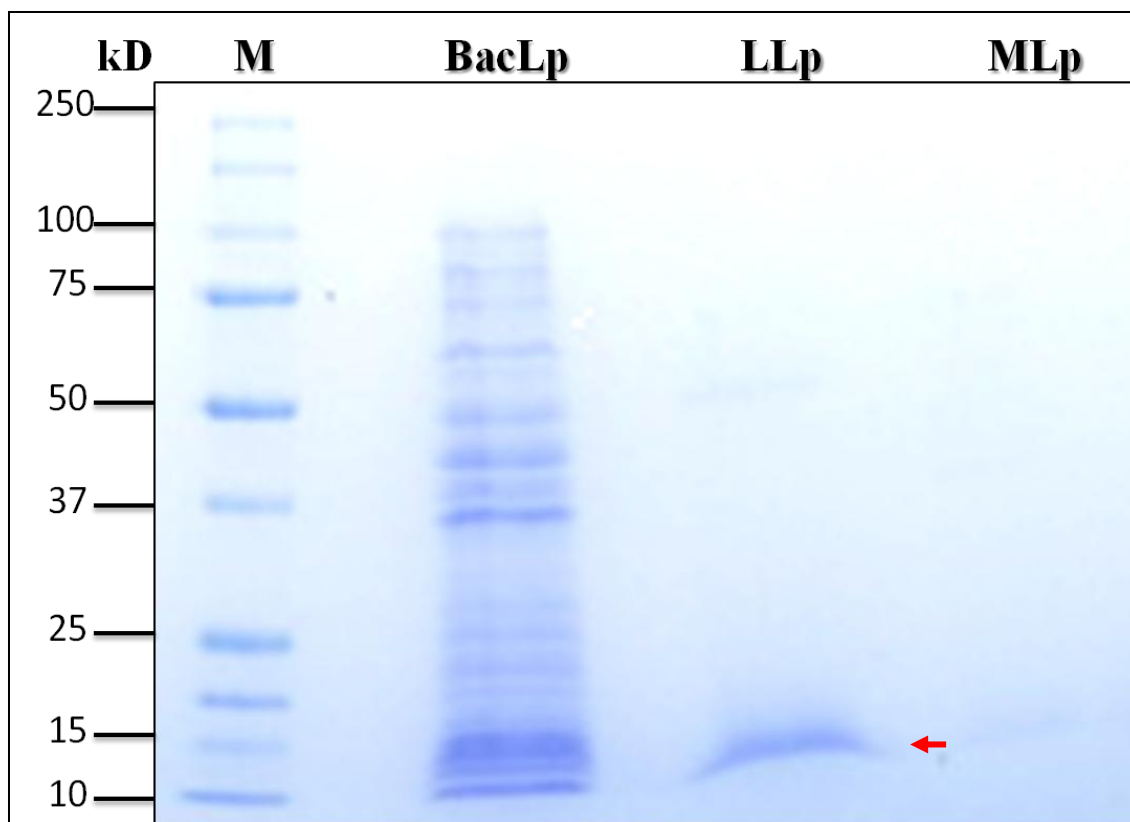
El análisis electroforético en geles de poliacrilamida de las proteínas se basa en la separación de éstas de acuerdo a su peso molecular. En la figura 22 se observa en el carril del liofilizado de las bacteriocinas de *L. casei* (LLc), una banda tenue (flecha roja) aproximadamente de 10 kDa y de igual forma en el carril de los metabolitos de *L. casei* (MLc).

De acuerdo a la tonalidad de la banda en el carril LLc se observa que tiene menor cantidad de proteínas comparado con el cultivo de *L. plantarum*.



**Fig. 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida de bacteriocinas de *L. casei*.** M.-marcador. BacLc.-Cultivo de *L. casei*. LLc.-Liofilizado de bacteriocinas de *L. casei*. MLc.-Metabolitos de *L. casei*.

En la figura 23 se observa que el cultivo de *L. plantarum* presenta mayor número de bandas en relación con el patrón de corrimiento de la muestra de cultivo de *L. casei*. En ambos cultivos también se observa la presencia muy marcada de proteínas de peso molecular de aproximadamente 37, 50 y 75 kDa. Se aprecia una banda de mayor intensidad (flecha roja) aproximadamente de 10 KDa en el carril de liofilizado de las bacteriocinas de *L. plantarum*. Esto indica que hay mayor presencia de proteínas en el cultivo de *L. plantarum* que en el cultivo de *L. casei*.



**Fig. 23. Electroforesis en gel de poliacrilamida de bacteriocinas de *L. plantarum*.** M.-marcador. BacLp.-Cultivo de *L. plantarum*. LLp.-Liofilizado de bacteriocinas de *L. plantarum*. MLp.-Metabolitos de *L. plantarum*.

## 8.5 Bioensayo de bacteriocinas sobre *E. histolytica*

### 8.5.1 Actividad biológica de bacteriocinas sobre trofozoítos y ESQ de *E. histolytica*

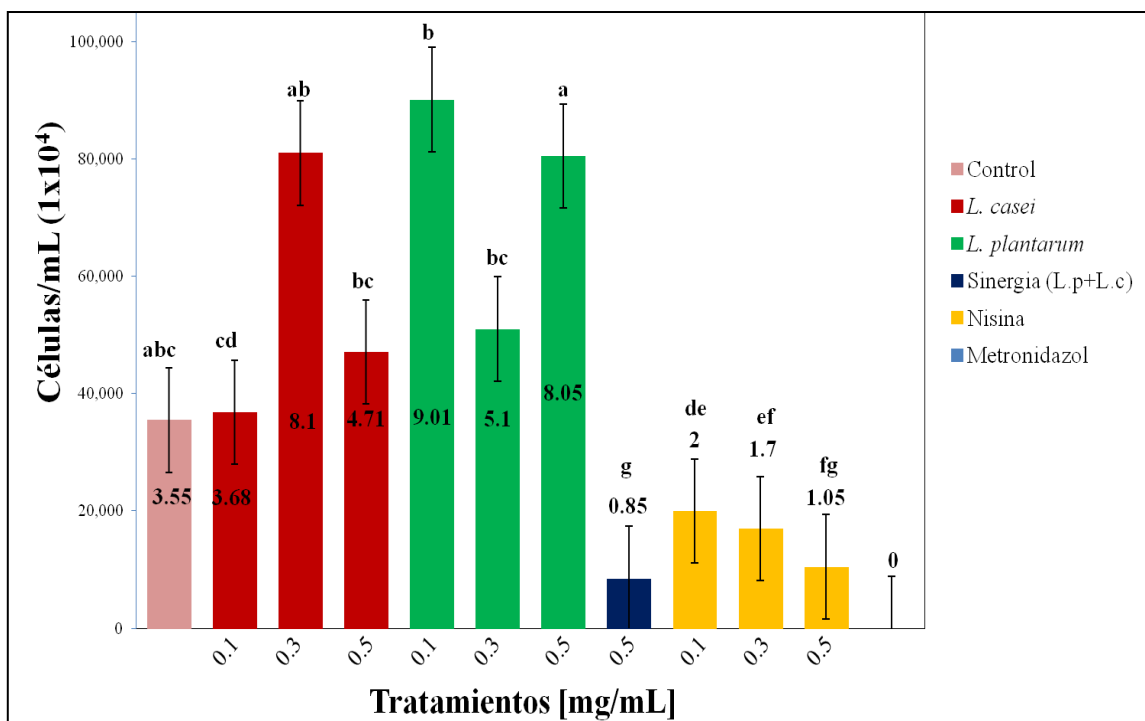
Se obtuvieron los liofilizados de bacteriocinas de los probióticos de *L. casei* y *L. plantarum* para evaluarse a diferentes concentraciones tanto en trofozoíto como de ESQ. En la figura 24 se muestra el rendimiento celular de trofozoítos en presencia de bacteriocinas. Se observó que el rendimiento del control con respecto a los tratamientos fue variable. Además de los tratamientos por separado, se realizó una sinergia combinando las bacteriocinas de *L. plantarum* y *L. casei* en el cual se observó el mayor porcentaje de inhibición con respecto al control y los demás tratamientos.



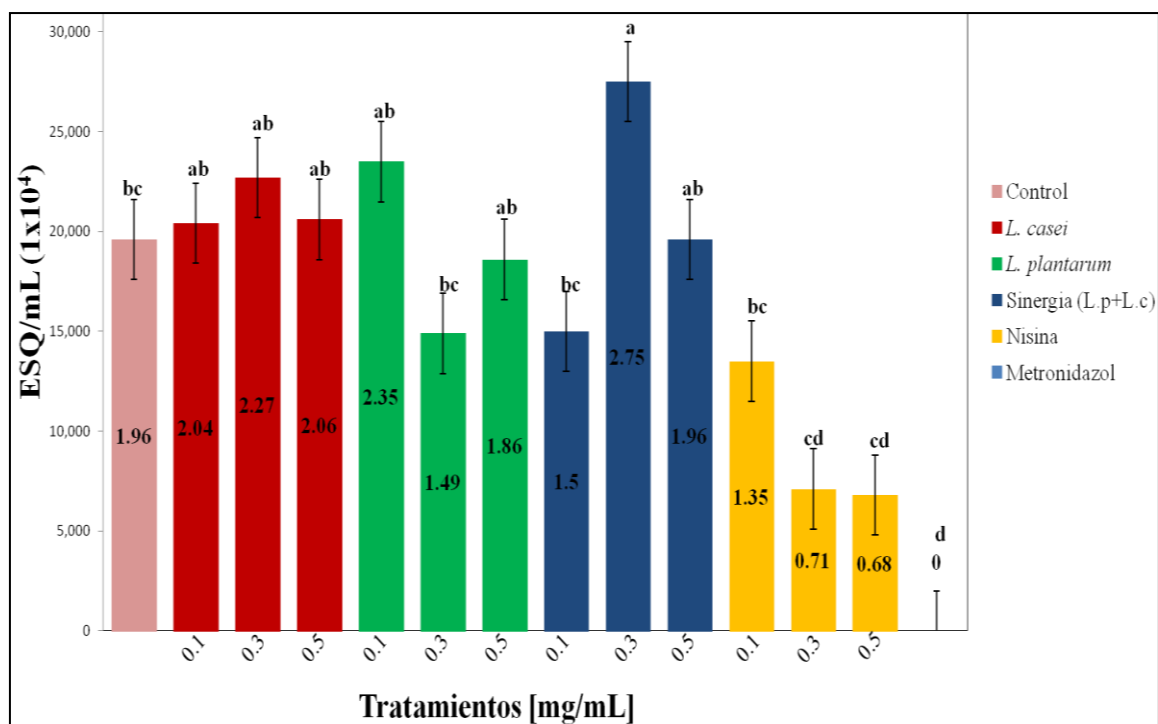
Los tratamientos con las bacteriocinas de *L. plantarum* y *L. casei* aumentaron el rendimiento celular de trofozoítos mientras que la sinergia (*L. plantarum*+*L. casei*) inhibieron el crecimiento. La bacteriocina comercial (Nisina) presentó inhibición con respecto al control. El análisis estadístico (anexo I) mostró que existe diferencia significativa entre los diferentes tratamientos. Además de que el análisis mediante la comparación de medias mostró que existen 7 grupos diferentes, los cuales se muestran con letra en el gráfico.

En la figura 25 se muestra el rendimiento celular de ESQ en presencia de bacteriocinas. Se observó que el tratamiento con bacteriocinas de *L. casei* no mostró diferencia significativa con respecto al control. Pero el tratamiento con bacteriocinas de *L. plantarum* a la concentración de 0.3 mg/mL y la sinergia al 0.1 mg/mL mostraron diferencia significativa con respecto al control. Se observó inhibición por parte del tratamiento con nisina tanto del estadio de trofozoíto como de ESQ.

El tratamiento con la bacteriocina comercial fue el que presentó mayor porcentaje de inhibición con respecto al control. El análisis estadístico (anexo I) mostró que existe diferencia significativa entre los diferentes tratamientos. En el análisis mediante la comparación de medias mostró que existen 4 grupos diferentes, los cuales se muestran con letra en el gráfico.



**Fig. 24. Rendimiento celular de trofozoítos de *E. histolytica* en presencia de bacteriocinas.** Comparación del rendimiento celular de trofozoítos cultivados en presencia de liofilizado de bacteriocinas de *L. casei* y *L. plantarum* a las concentraciones de 0.1, 0.3 y 0.5 mg/mL; sinergia de bacteriocinas a la concentración de 0.5 mg/mL y nisina (bacteriocina comercial) a las concentraciones de 0.1, 0.3 y 0.5 mg/mL.

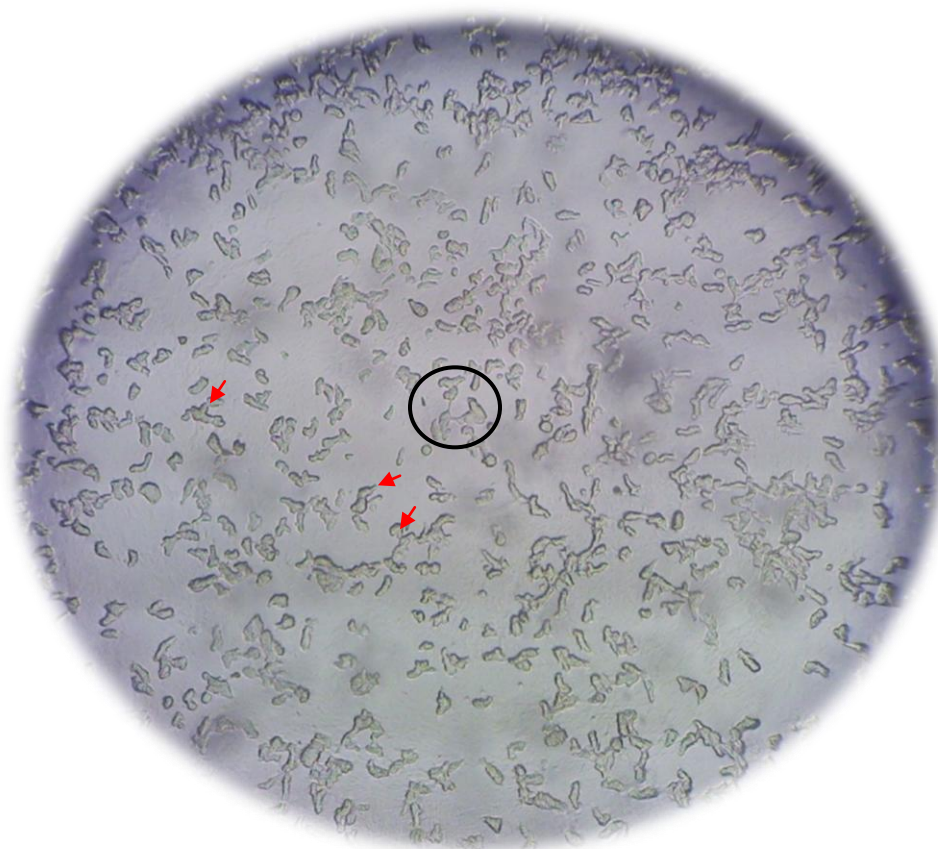


**Fig. 25. Rendimiento celular de ESQ de *E. histolytica* en presencia de bacteriocinas.** Comparación del rendimiento celular de ESQ cultivados en presencia de liofilizado de bacteriocinas de *L. casei* y *L. plantarum*, sinergia de bacteriocinas y nisina (bacteriocina comercial) a las concentraciones de 0.1, 0.3 y 0.5 mg/mL.

## 8.6. Microscopía

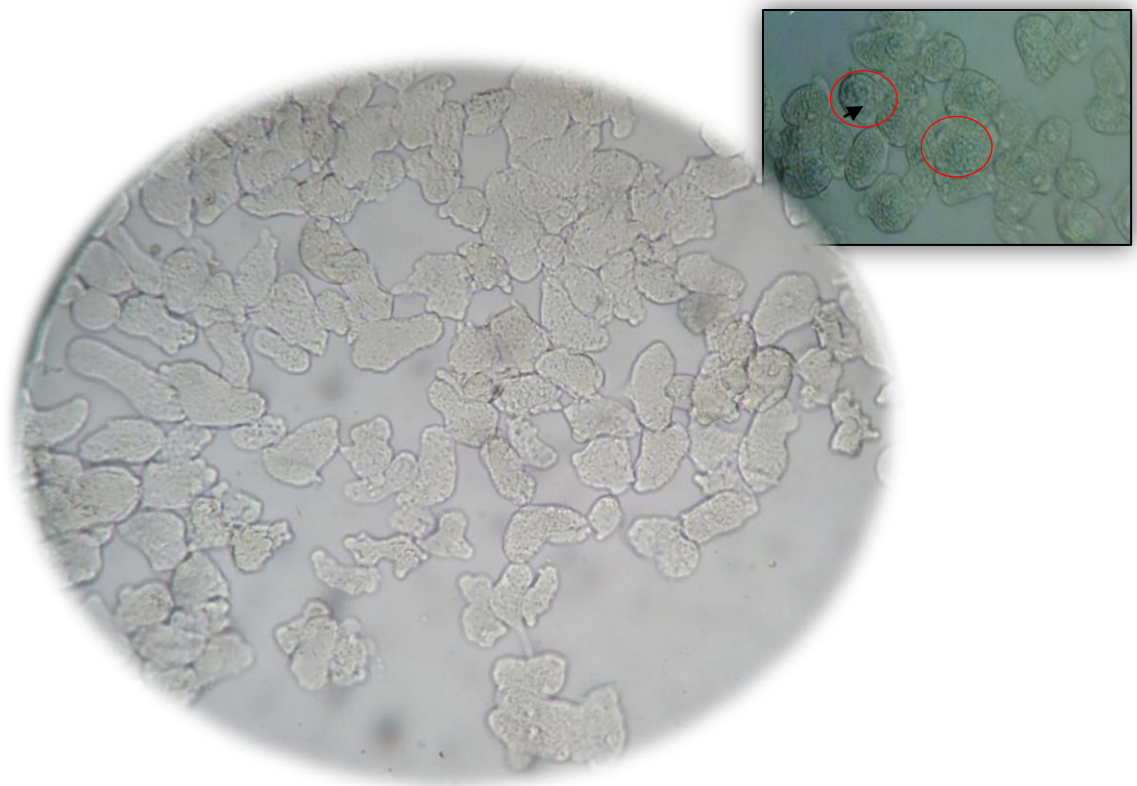
### 8.6.1 Microscopio Óptico (MO)

En la figura 26 se observa el cultivo típico de trofozoítos de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas *in vitro*, en la imagen se observa las células cultivadas por 72 h, las cuales se encuentran en fase logarítmica (ver Fig. 15), las cuales se observan en división (ver círculo negro) y presentan crecimiento asincrónico; así mismo se observa una morfología pleomórfica la cual es típica de los trofozoítos de este parásito, también presentan una gran cantidad de pseudópodos (flechas rojas) típicos de un cultivo de trofozoítos sanos y en división.



**Fig. 26. Observación de trofozoítos de *E. histolytica* en fase logarítmica al Microscopio Óptico.** Se observa el cultivo de trofozoítos en fase logarítmica, las células muestran aspecto pleomórfico y gran cantidad de pseudópodos (100X).

En la Fig. 27 se muestra un cultivo de trofozoítos de *E. histolytica* al inicio de la fase estacionaria al día 4 de incubación (ver Fig. 15), se observa mayor cantidad de células en comparación con la Fig. 26, al iniciar la fase estacionaria las células se observan en proceso de adhesión trofozoíto-trofozoíto (ver círculo naranja), las células comienzan a redondearse (flecha roja) y en el medio se observan detritus. En el recuadro se observan algunas células (ver círculo rojo) las cuales presentan dos núcleos (flecha negra).



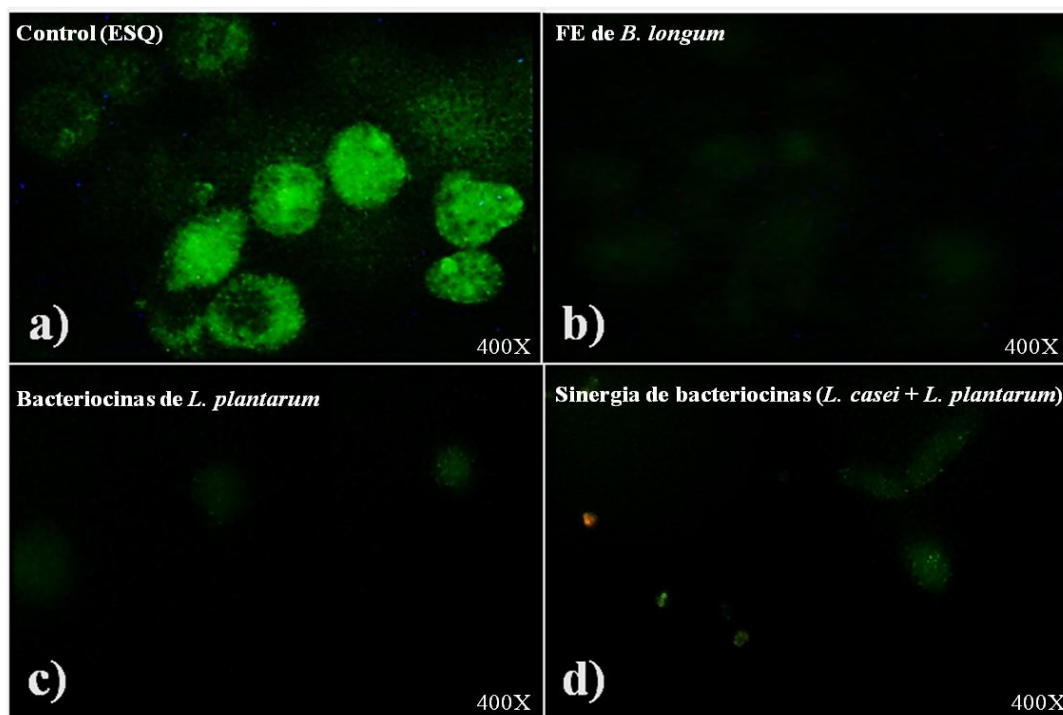
**Fig. 27. Observación de trofozoítos de *E. histolytica* en fase estacionaria al Microscopio Óptico.**

Se observa el cultivo de trofozoítos en el inicio de la fase estacionaria, las células muestran aspecto esférico, ya no presentan pseudópodos y comienzan a redondearse (flecha roja) (100X). En la imagen del recuadro se observan en los círculos rojos algunas células binucleadas, las cuales se indican mediante una flecha negra, (400X).

## 8.6.2. Microscopio de Fluorescencia (MF)

### 8.6.2.1 Observación de ESQ de *E. histolytica* cultivadas en presencia de FEP

**y bacteriocinas:** Se llevó a cabo la preparación de muestras de ESQ de *E. histolytica* obtenidos *in vitro* y se observaron al microscopio de fluorescencia mediante la reacción con calcoflúor. En la figura 28 se muestra la comparación del patrón de reacción con el calcoflúor de ESQ en presencia de FEP y bacteriocinas. Se observó que las ESQ del control positivo muestran una mayor fluorescencia en comparación con las ESQ en tratamiento. Esto es porque en los cultivos normales existe mayor cantidad de quitina en las estructuras, y el calcoflúor tiene la propiedad de reaccionar con ésta. También se observó que en las ESQ control hay mayor cantidad de conglomerados en comparación de las ESQ tratadas donde hay escasas células. Las ESQ bajo tratamiento de FE de *B. longum*, bacteriocinas de *L. plantarum* y la sinergia de bacteriocinas se observaron con menor fluorescencia y en menor cantidad de células comparado con las ESQ control.



**Fig. 28. Comparación del patrón de reacción con calcoflúor de ESQ en presencia de FEP y bacteriocinas.** a) control positivo, ESQ de *E. histolytica* obtenidas *in vitro*. b) ESQ de *E. histolytica* en tratamiento con FE de *B. longum*. c) ESQ de *E. histolytica* en tratamiento con bacteriocinas de *L. plantarum* y d) ESQ de *E. histolytica* en tratamiento con sinergia de bacteriocinas (*L. casei* + *L. plantarum*).

### **8.6.3 Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)**

#### **8.6.3.1. Análisis morfológico de trofozoítos de *E. histolytica*:**

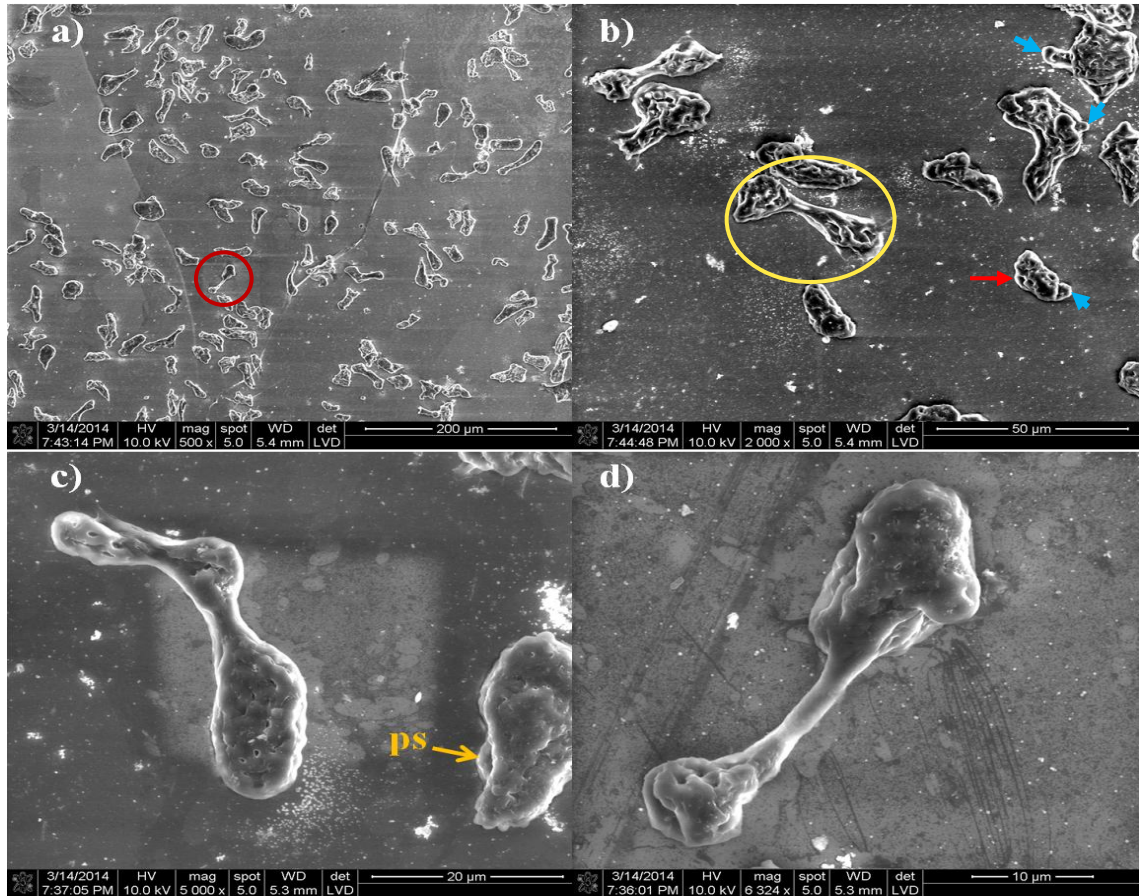
Se llevó a cabo la preparación de muestras de diferentes fases de estadio del trofozoíto para la observación mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). En la figura 29 se muestran diversos aspectos panorámicos de un cultivo normal en fase logarítmica y las características a diferentes aumentos de la superficie de la membrana celular de un trofozoíto.

En la figura 29-a, se observa la morfología de trofozoítos de *E. histolytica* en un cultivo en crecimiento asincrónico, los trofozoítos muestran una morfología pleomórfica típica. La micrografía fue tomada a una magnitud de 500X.

En el inciso b se muestra la micrografía a una magnitud de 2000X, donde se observan trofozoítos con una topografía irregular, además de que se observan algunas células en proceso de división (ver círculo amarillo), al centro de la célula en división se observa una elongación de la misma donde se aprecia una superficie más “lisa” en el centro en comparación con el resto del cuerpo celular. Los trofozoítos muestran hendiduras en su superficie, semejantes a poros (flecha roja), se observan pseudópodos (flecha azul) en algunas células. Las células en esta micrografía se observan en diversas longitudes.

En los incisos c y d se observan trofozoítos en proceso de división con un aumento a 5000X y 6324X, respectivamente. La topografía de los trofozoítos se muestra irregular, con hendiduras que asemejan a poros. En el centro de las células en división se observa una elongación aparentemente más “lisa” comparando con el resto de la célula. En el inciso c se observa un trofozoíto con pseudópodo (flecha amarilla, ps).

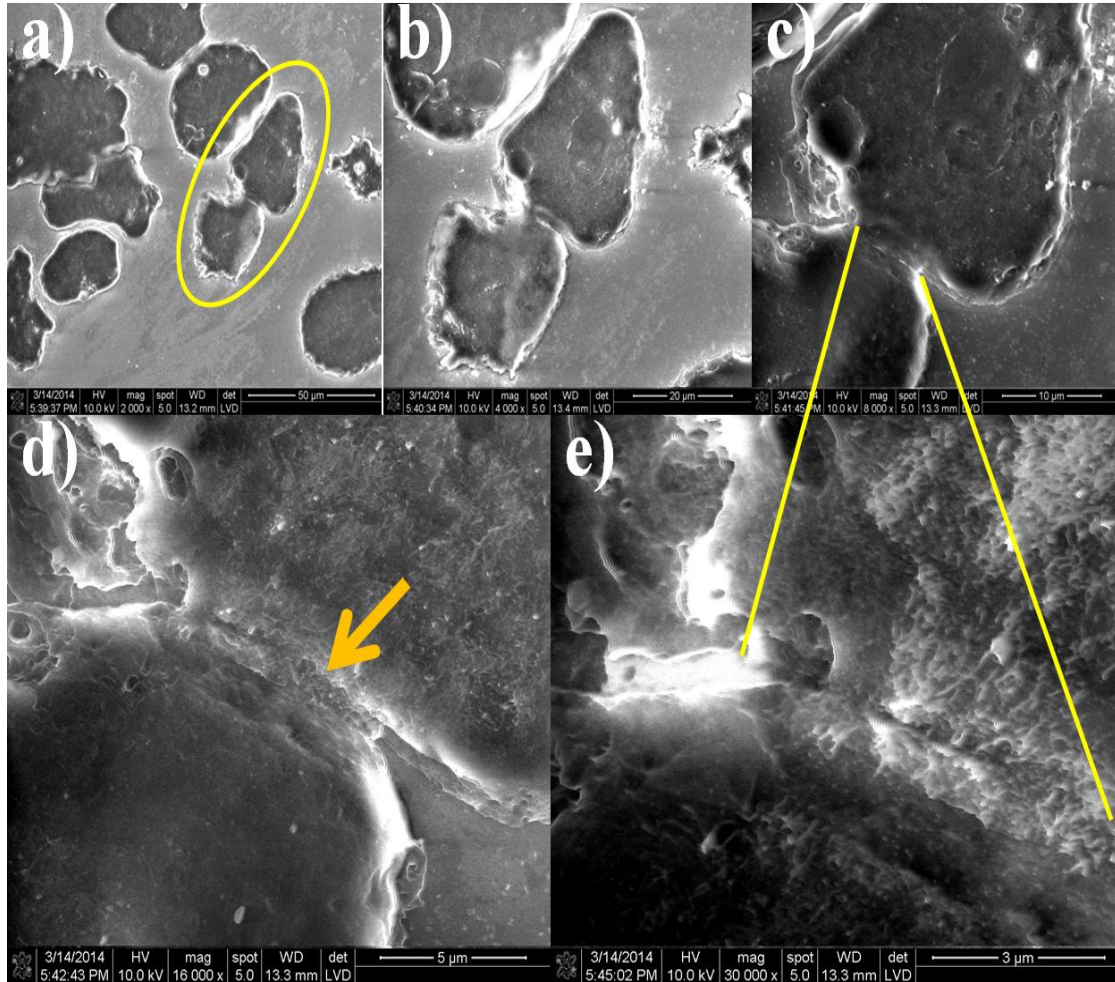




**Fig. 29. Aspecto de trofozoítos de *E. histolytica* en fase logarítmica observados al MEB.**

a) Imagen panorámica de trofozoítos en proceso de división celular (ver círculo rojo), imágenes tomadas a la mitad de la fase logarítmica de la cinética de crecimiento. b) cultivo asincrónico de trofozoítos. c) aspecto típico de trofozoíto con pequeños pseudópodos (ps). d) detalles de la membrana celular de un trofozoíto en proceso de división celular.

En la figura 30 se observa la adhesión entre trofozoíto-trofozoíto a través de uniones celulares mediante microfibrillas que miden aproximadamente  $0.3 \mu\text{m}$ . El cultivo fue tomado en la fase estacionaria. Se aprecian las características a diferentes aumentos de observación de la superficie de la membrana celular en el proceso de adhesión trofozoíto-trofozoíto (inciso a, círculo amarillo). Al principio y final de esta fase los trofozoítos comienzan a agruparse y adherirse entre sí. En los incisos b y c se observa un par de trofozoítos adheridos entre sí, en una magnitud de  $4000\times$  y  $8000\times$ , respectivamente. Además se aprecia una membrana celular irregular del trofozoíto. En los incisos d y e se observa la imagen en aumento en una magnitud de  $16\,000\times$  y  $30\,000\times$ , respectivamente. Se observa la topografía irregular de un trofozoíto en proceso de adhesión a través de microfibrillas (flecha amarilla).

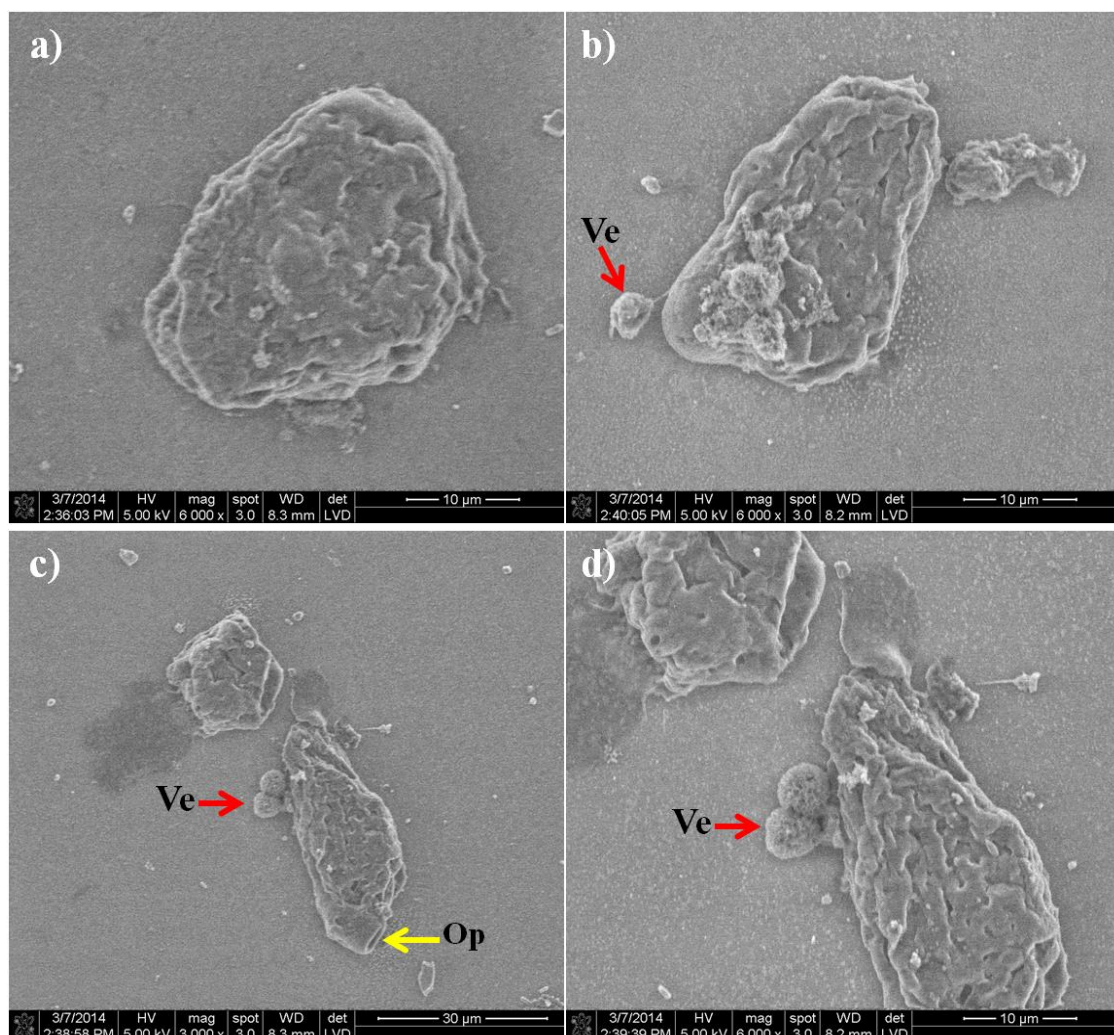


**Fig. 30. Aspecto de trofozoítos de *E. histolytica* en fase estacionaria observados al MEB.**

a) imagen panorámica de trofozoítos en proceso de adhesión en la fase estacionaria. b) y c) observación de un par de trofozoítos adheridos entre sí, magnitud de 4000X y 8000X. d) y e) detalles de la membrana celular de un trofozoíto en proceso de adhesión a través de microfibrillas.

En la figura 31 se observa los detalles de las membranas celulares (mc) de trofozoítos al final de la fase estacionaria. En el inciso a, se observa un trofozoíto comenzando a redondearse y midiendo aproximadamente 40  $\mu\text{m}$ , con una membrana irregular, depresiones y hendiduras en su superficie, a una magnitud de 6000X. Los incisos b, c y d muestran una topografía típica de un trofozoíto al final de la fase estacionaria, donde se observa una membrana celular rugosa, irregular y con depresiones. Además se observa la liberación de material a través de vesículas (flechas rojas, Ve), lo cual es característico antes de que las células inicien el proceso de enquistamiento (siempre y cuando tenga las condiciones adecuadas) o bien antes de la muerte celular. En el inciso c, se observa un opérculo (flecha amarilla, Op) a una magnitud de 3000X.



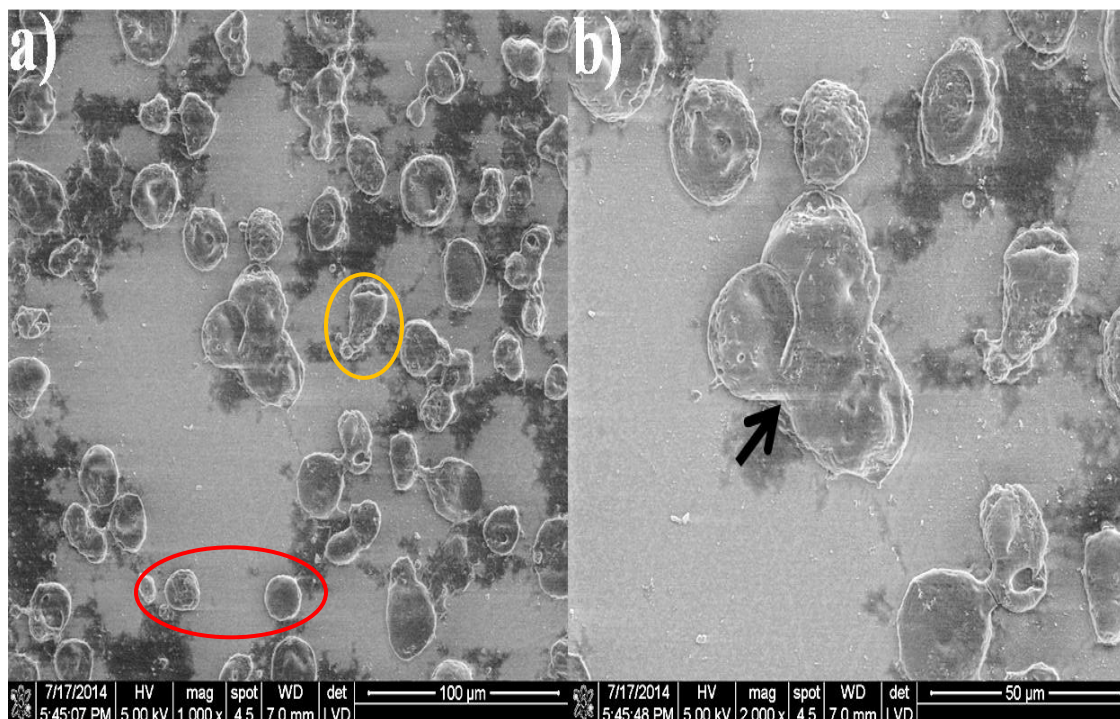


**Fig. 31. Aspecto de trofozoítos de *E. histolytica* al final de la fase estacionaria observados al MEB.**  
a) trofozoítos tomados al final de la fase estacionaria, superficie celular de forma irregular con elevaciones, rugosidad y depresiones. b), c) y d) aspecto típico de un trofozoíto al final de la fase estacionaria donde se observan vesículas (Ve) y un opérculo (Op).

### 8.6.3.2 Análisis morfológico de ESQ de *E. histolytica*:

Por otra parte se llevó a cabo la preparación de ESQ de *E. histolytica* obtenidos *in vitro* y resistentes a detergente Tritón X-100 al 1% y se observaron al MEB. En la figura 32 se muestra una imagen panorámica de un cultivo de ESQ a los 4 días de incubación, donde las células comienzan a redondearse. En el inciso a, se observan algunas ESQ con la morfología típica esférica (círculo rojo), con depresiones y hendiduras. Además se muestran algunas células que se encuentran aún en fase de trofozoíto (círculo amarillo).

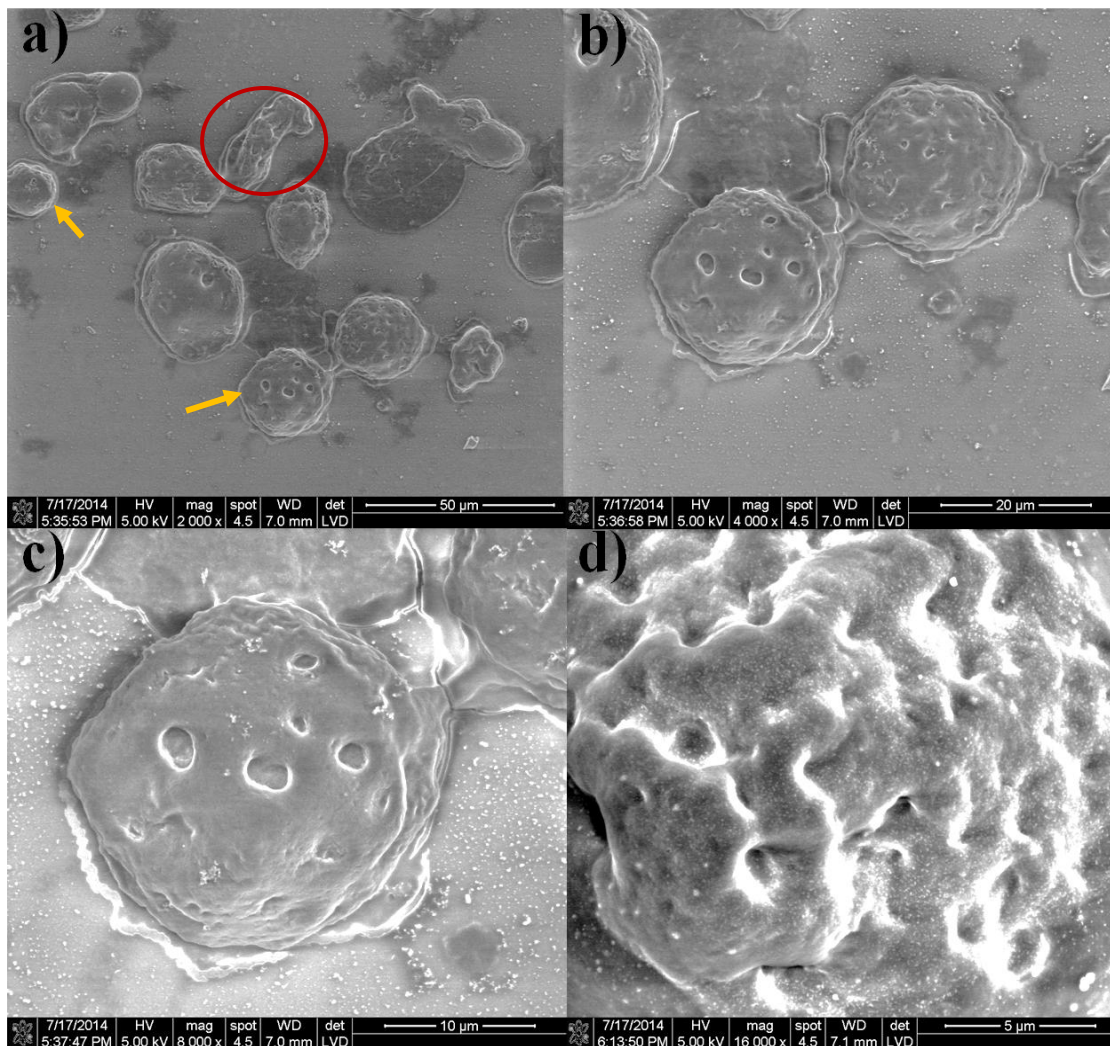
La imagen panorámica del cultivo de ESQ se presenta a una magnitud de 1000X. En el inciso b se muestra una imagen a una magnitud de 2000X, donde se observa un conglomerado de ESQ con un aspecto esférico, unidas entre sí por la prolongación de sus paredes celulares (flecha negra). Se observa la topografía rugosa e irregular típica de éstas células.



**Fig. 32.** Aspecto panorámico de cultivo de ESQ de *E. histolytica*, con 4 días de incubación, observados al MEB. a) Imagen panorámica de ESQ. b) Conglomerado de ESQ con aspecto esférico, unidas entre sí (flecha negra).

En la figura 33 se muestra la topografía típica de ESQ fijadas con glutaraldehído al 2.5%, la cual se aprecia con rugosidad, hendiduras y una pared quística. En el inciso a se observan células, con 4 días de incubación, aún en fase de trofozoíto (círculo rojo) y otras ESQ con la morfología típica esférica (flechas amarillas). La morfología celular de las ESQ se aprecia con rugosidades y depresiones, a una magnitud de 2000X. Los incisos b y c muestran a diferentes aumentos las ESQ con una magnitud de 4000X y 8000X, respectivamente. Se observan las células con una topografía típica esférica, con rugosidades, hendiduras, depresiones y una pared quística irregular. En el inciso d se muestra una ESQ a una magnitud de 16 000X, las células fueron tomadas de un cultivo de 7 días de incubación. Se observa una topografía típica rugosa e irregular, con hendiduras y una pared quística.





**Fig. 33. Aspecto de la topografía de ESQ de *E. histolytica* observados al MEB.** a) cultivo normal de ESQ fijadas con glutaraldehído al 2.5%, incubadas a los 4 días. b) c) y d) Micrografías que muestran la topografía de la superficie de ESQ, la cual se aprecia con rugosidades, hendiduras y una pared quística.

#### 8.6.4 Microscopio de Fuerza Atómica (MFA)

##### 8.6.4.1 Evaluación y actividad biológica de FEP y bacteriocinas sobre trofozoítos y su análisis morfológico

Se llevó a cabo la preparación de muestras de trofozoítos bajo diferentes tratamientos para la observación mediante Microscopía de Fuerza Atómica (MFA) por el modo semi-contacto. El análisis morfológico de trofozoítos en presencia de tratamientos fue analizado mediante el software NOVA versión 1.1.0.1921 y WSxM v5.0 Develop 8.0 y los trofozoítos control se analizaron mediante el software MF3D Igor Pro.

En la Figura 34-a se observa el aspecto morfológico de trofozoítos de *E. histolytica* control sin tratamiento observado mediante MFA (Oxford Instruments Asylum Research MFP-3D Classic) por el modo contacto. En la imagen se observa en tono amarillo claro la zona más alta de la célula, estas elevaciones se observan principalmente en la periferia de la célula y escasas protuberancias altas en la zona media de esta célula, la altura máxima que se observa es de 4.06  $\mu\text{m}$ , las zonas que se aprecian en tono claro amarillo podrían corresponder a la emisión de pseudópodos característicos del movimiento amebiano, así mismo se observa la morfología pleomórfica típica de *E. histolytica*, para determinar el volumen celular esta característica pleomórfica representó un reto, y el volumen se calculó empleando un algoritmo matemático diseñado específicamente para este microorganismo (patente en trámite). Además se muestra un valor de altura del cuerpo de *E. histolytica* que va desde un rango de 0.8 a 1.8  $\mu\text{m}$  aproximadamente, observándose en el resto del cuerpo de la célula ligeras depresiones y elevaciones, permitiendo observar un aspecto rugoso en el resto del cuerpo de la célula.

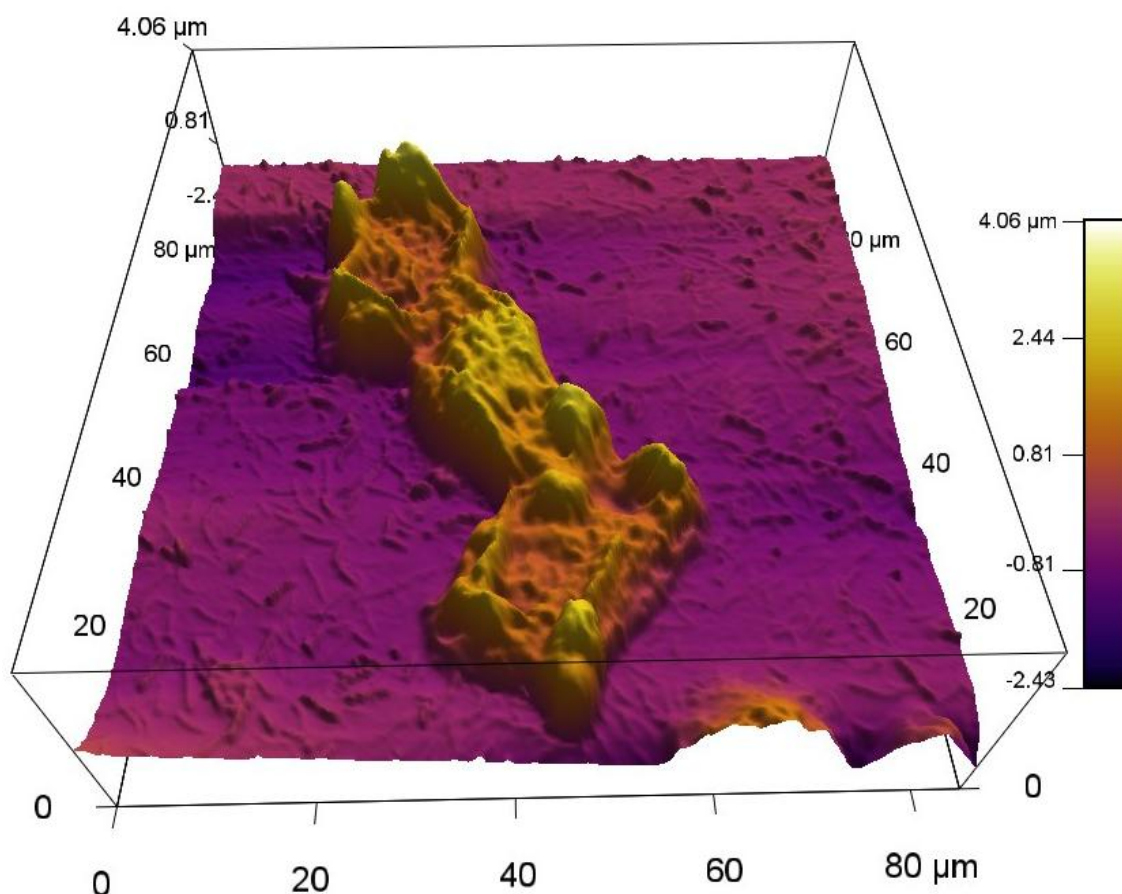


Fig. 34-a. Micrografía en 3D de un trofozoíto de *E. histolytica* observado al MFA por el modo contacto.

En la Figura 34-b se observa el aspecto morfológico de trofozoítos de *E. histolytica* bajo diferentes tratamientos observados mediante MFA (AFM-Ntegra Prima NT-MDT) por el modo semi-contacto.

En la imagen se observan las micrografías correspondientes a trofozoítos de *E. histolytica* con tratamiento de sinergia de bacteriocinas (columna A) y FE de *L. plantarum* (columna B y C), FE de *B. longum* (columna D y E), y el tratamiento de FE de *L. casei* (columna F y G).

La intensidad de claridad en las imágenes de altura representa zonas más altas de las células en comparación con las partes más oscuras que muestran las zonas más profundas.

En el tratamiento de la sinergia de bacteriocinas (*L. plantarum*+*L. casei*) (columna A) se observa la micrografía correspondiente a la altura de un trofozoíto de *E. histolytica*, el cual muestra una zona muy clara lo cual representa la mayor altura de la célula, en este caso tiene un valor de 5.912  $\mu\text{m}$ . En cuanto a la morfología del trofozoíto, éste se aprecia más redondeado que el trofozoíto control (Fig. 34-a), y presenta un diámetro de 30.45  $\mu\text{m}$  aproximadamente, con respecto a la fase y magnitud, la información obtenida indica que la membrana celular del trofozoíto presenta la misma homogeneidad en la composición de la membrana celular con una magnitud de 40nA (imagen con medidas no mostradas). En la micrografía en 3D se observa la máxima altura de 5  $\mu\text{m}$  y se observa una topografía regular.

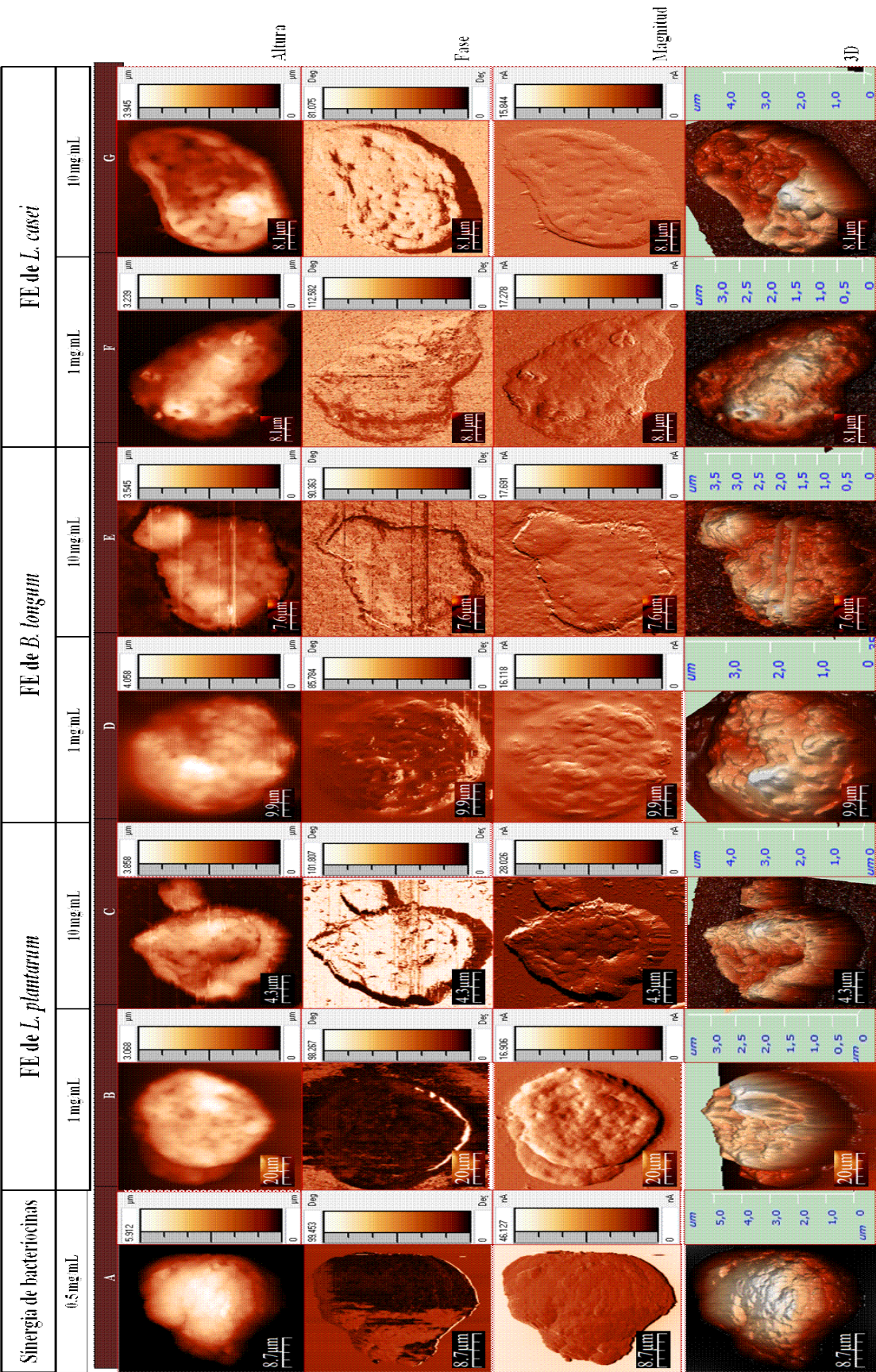
Las imágenes de altura de los trofozoítos en presencia de los tratamientos de FE de *L. plantarum*, *B. longum* y *L. casei* presentan diferencias de alturas entre una zona y otra de la misma célula. Los trofozoítos en presencia de FE de *L. plantarum* y *L. casei* a 10 mg/mL presentan una zona con poca altura (zona oscura) lo cual indica una depresión de la célula.

Las imágenes de fase en el tratamiento de FE de *L. plantarum* a 1mg/mL mostró 90° y con una magnitud de 16nA. En cambio al tratamiento de 10 mg/mL la fase se observó a 170° y con una magnitud similar de 15nA (imagen con medidas no mostradas).

En el tratamiento de FE de *B. longum* a 1mg/mL mostró una fase de 170° y 16nA de magnitud. En el tratamiento de 10 mg/mL la fase fue de 90° y 16nA de magnitud. En el tratamiento de FE de *L. casei* a 1 y 10 mg/mL se observó una fase 120° y 90° respectivamente, y con una magnitud de 16nA y 14nA respectivamente (Figura 34-b) (imágenes con medidas no mostradas).

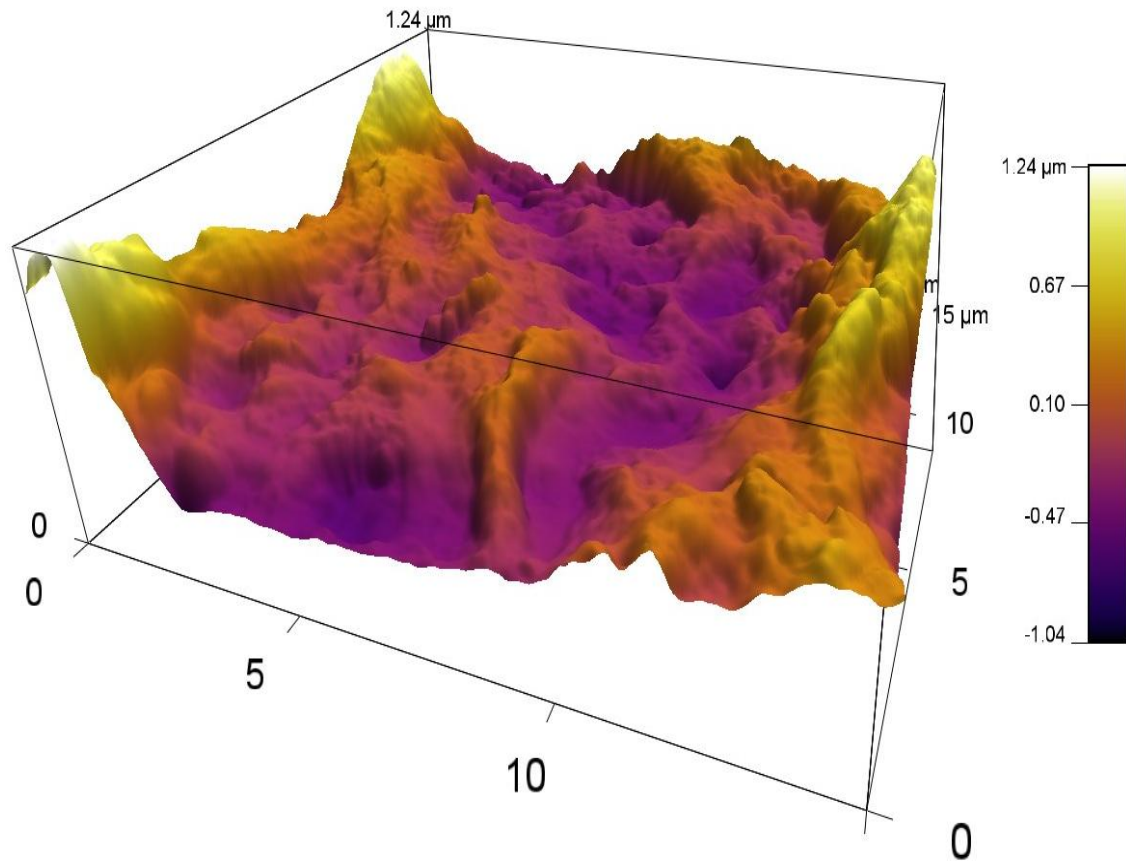
En las imágenes de 3D de los tratamientos con FE de *L. plantarum*, de *B. longum* y *L. casei* al 1 y 10 mg/mL se observan trofozoítos con mayores cambios morfológicos en las membranas celulares comparados con los trofozoítos controles. La morfología de las células se muestra con depresiones, protuberancias, hendiduras y rugosidad. Las imágenes en 3D de las columnas D y H presentan trofozoítos con gran hundimiento y depresión en casi la totalidad de la célula (Figura 34-b).





**Fig. 34-b. Aspecto de trofozoítos de *E. histolytica* observados al MFA por el modo semi-contacto.** A) Trofozoíto de un cultivo normal sin tratamiento. B) con tratamiento de sinergia de bacteriocinas (*L. plantarum*+*L. casei*) a 0,5 mg/mL. C) y D) con tratamiento de FE de *L. plantarum* a 1 y 10 mg/mL. E) y F) con tratamiento de FE de *B. longum* a 1 y 10 mg/mL. G) y H) con tratamiento de FE de *L. casei* a 1 y 10 mg/mL.

En la figura 35-a se observa la topografía de la membrana celular de un trofozoíto control observada a través de MFA (Oxford Instruments Asylum Research MFP-3D Classic) empleando el modo contacto. El análisis morfológico se realizó mediante el software MF3D Igor Pro.



**Fig. 35-a. Análisis de la topografía de la membrana celular de trofozoítos de *E. histolytica* observados al MFA por el modo contacto.**

En la micrografía de la Figura 35-a de la topografía de la membrana celular, se observan una gran cantidad de depresiones y elevaciones, presenta una altura máxima de 1.24 μm, la cual se observa en tono amarillo o zonas claras y las zonas más profundas en tonos oscuros.

En la Figura 35-b se observan trofozoítos con tratamiento de sinergia de bacteriocinas y FEP. El análisis morfológico de los trofozoítos que se presentan en la columna A fue analizado mediante el software MF3D Igor Pro.



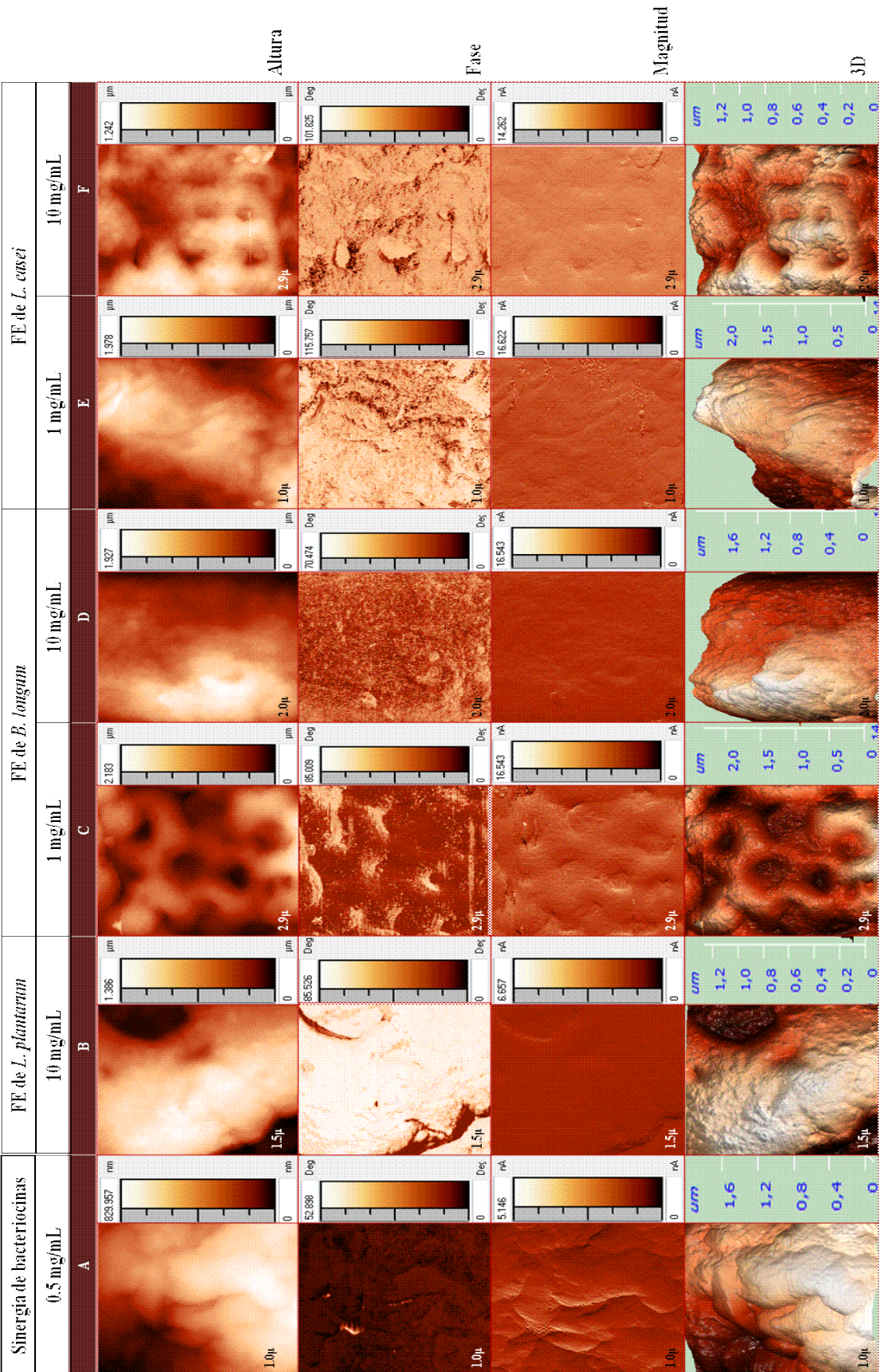
Se observa una zona del trofozoíto con poca altura, de hasta 1  $\mu\text{m}$ . Además se muestra una imagen de magnitud con altura de 140 nm y en la imagen en 3D se observa que presenta una altura de 1.24  $\mu\text{m}$ .

En la imagen de altura del tratamiento con la sinergia de bacteriocinas (columna A) se observa una zona más oscura y profunda, lo cual en la imagen en 3D nos representa un trofozoíto con una hendidura semejante a poro, característico de las propiedades de las bacteriocinas, y además se puede apreciar una membrana celular rugosa. La imagen de fase presenta 45° y con una magnitud de 24nA (imagen con medidas no mostradas).

El tratamiento de FE de *L. plantarum* a 10mg/mL presenta una altura mayor con respecto a los demás tratamientos y una fase de 160° y 13nA de magnitud (imagen con medidas no mostradas). La superficie se observa con rugosidades y hendiduras, lo cual se puede observar en la imagen en 3D.

En el tratamiento de FE de *B. longum* a 1 y 10mg/mL se presenta una magnitud de 170° y 16nA (imagen con medidas no mostradas) para ambas concentraciones. Aunque la morfología cambie de una concentración a otra. En la imagen de altura de la columna E se presenta mayor altura con respecto a la imagen de altura de la columna D, lo cual en las imágenes en 3D se aprecian como mayor cantidad de hendiduras (columna D). En cambio en la imagen en 3D de la columna E se aprecia una hendidura semejante a poro.

El tratamiento de FE de *L. casei* a 1mg/mL presenta una fase de 110° y con una magnitud de 16nA (imagen con medidas no mostradas) y presenta una altura máxima de 2  $\mu\text{m}$ , en cambio en la concentración de 10 mg/mL su fase es de 100° y 14nA de magnitud (imagen con medidas no mostradas) y una altura de 1.2  $\mu\text{m}$ . Las imágenes en 3D muestran rugosidades y depresiones en la membrana celular del trofozoíto. La imagen en 3D de la columna G muestra una topología similar que en el tratamiento con FE de *B. longum* a 1 mg/mL (columna D). Los trofozoítos bajo este tratamiento presentan una altura maxima de 1.2  $\mu\text{m}$ . y 2  $\mu\text{m}$  respectivamente.



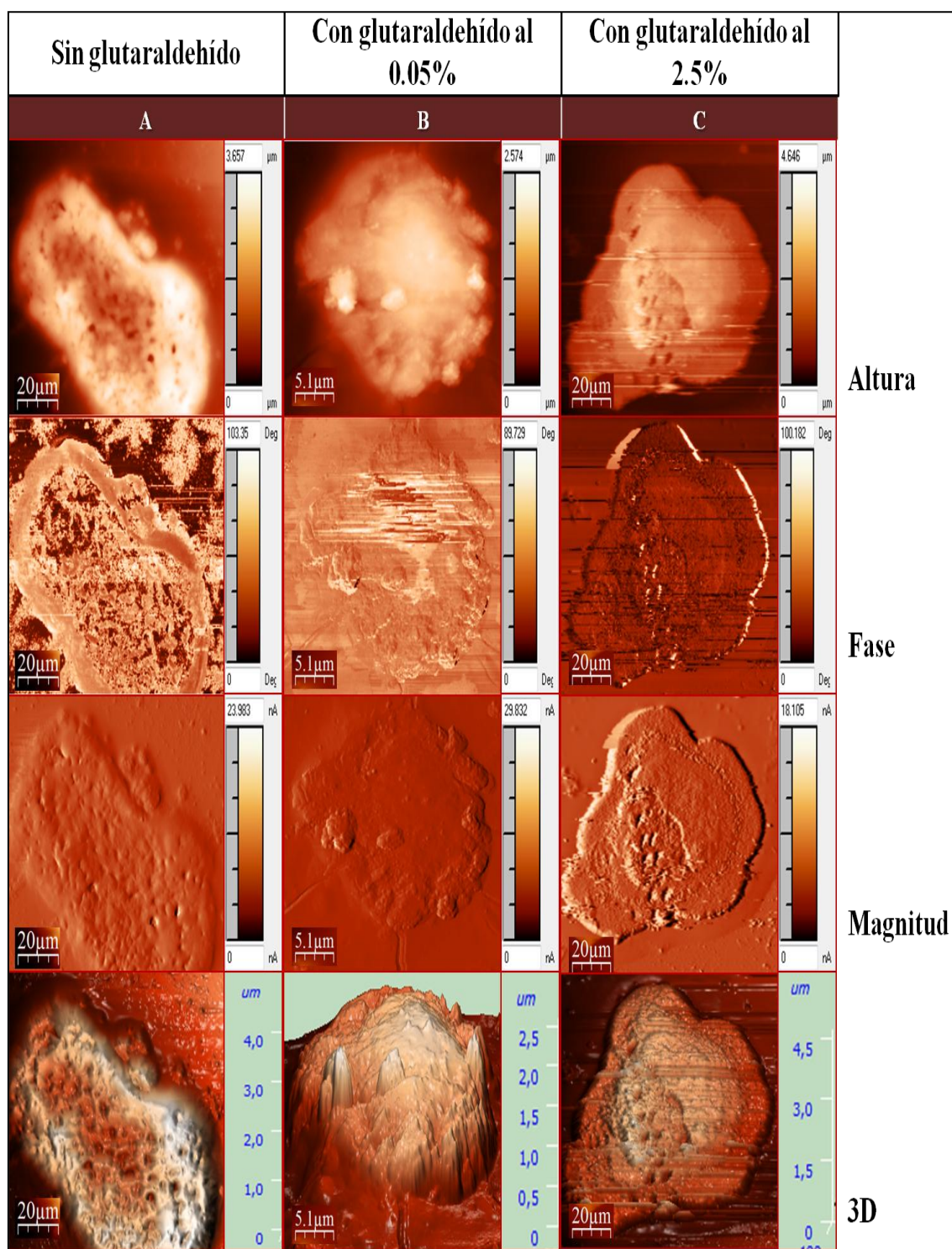
**Fig. 35-b. Aspecto de la membrana celular de trofozoitos de *E. histolytica* observados al MFA por el modo semi-contacto. A) Trofozoito con tratamiento de sinergia de bacteriocinas (*L. plantarum*+*L. casei*) a 0.5 mg/mL. B) con tratamiento de FE de *L. plantarum* a 10 mg/mL. C) y D) con tratamiento de FE de *B. longum* al y 10 mg/mL. E) y F) con tratamiento de FE de *L. casei* a 1 y 10 mg/mL.**

Por otra parte, también se realizó un análisis de microscopía bajo el modo semi-contacto a trofozoítos fijados a diferentes concentraciones de glutaraldehído (0, 0.05 y 2.5%). Los resultados se presentan en la Figura 36.

En la columna A se muestra un trofozoíto control sin glutaraldehído en donde se observa una morfología pleomórfica típica. La imagen de altura muestra que presenta mayor altura en comparación con los trofozoítos fijados con glutaraldehído 0.05 y 2.5%. Los trofozoítos presentaron una fase de  $180^\circ$  y una magnitud de 20nA (imagen con medidas no mostradas). En la imagen en 3D se observa un trofozoíto con una membrana celular rugosa e irregular, con hendiduras semejantes a poros y depresiones.

En las columnas B y C, se observa que una capa de glutaraldehído cubre las células. Las imágenes de alturas muestran una menor intensidad de claridad, lo cual indica que presentan menor altura comparadas con un trofozoíto control sin glutaraldehído. La fase se mostró de  $180^\circ$  y  $90^\circ$  respectivamente (imagen con medidas no mostradas). Y con una magnitud de 30 nA para la concentración de 0.05 % de glutaraldehído y de 18 nA para la concentración de 2.5 % de glutaraldehído. En las imágenes en 3D se observan protuberancias, rugosidad e irregularidades en la membrana celular de los trofozoítos.





**Fig. 36.** Aspecto de trofozoítos de *E. histolytica* observados al MFA por el modo semi-contacto fijados con glutaraldehído. A) Trofozoíto control sin glutaraldehído. B) con glutaraldehído al 0.05 %. C) con glutaraldehído al 2.5 %.

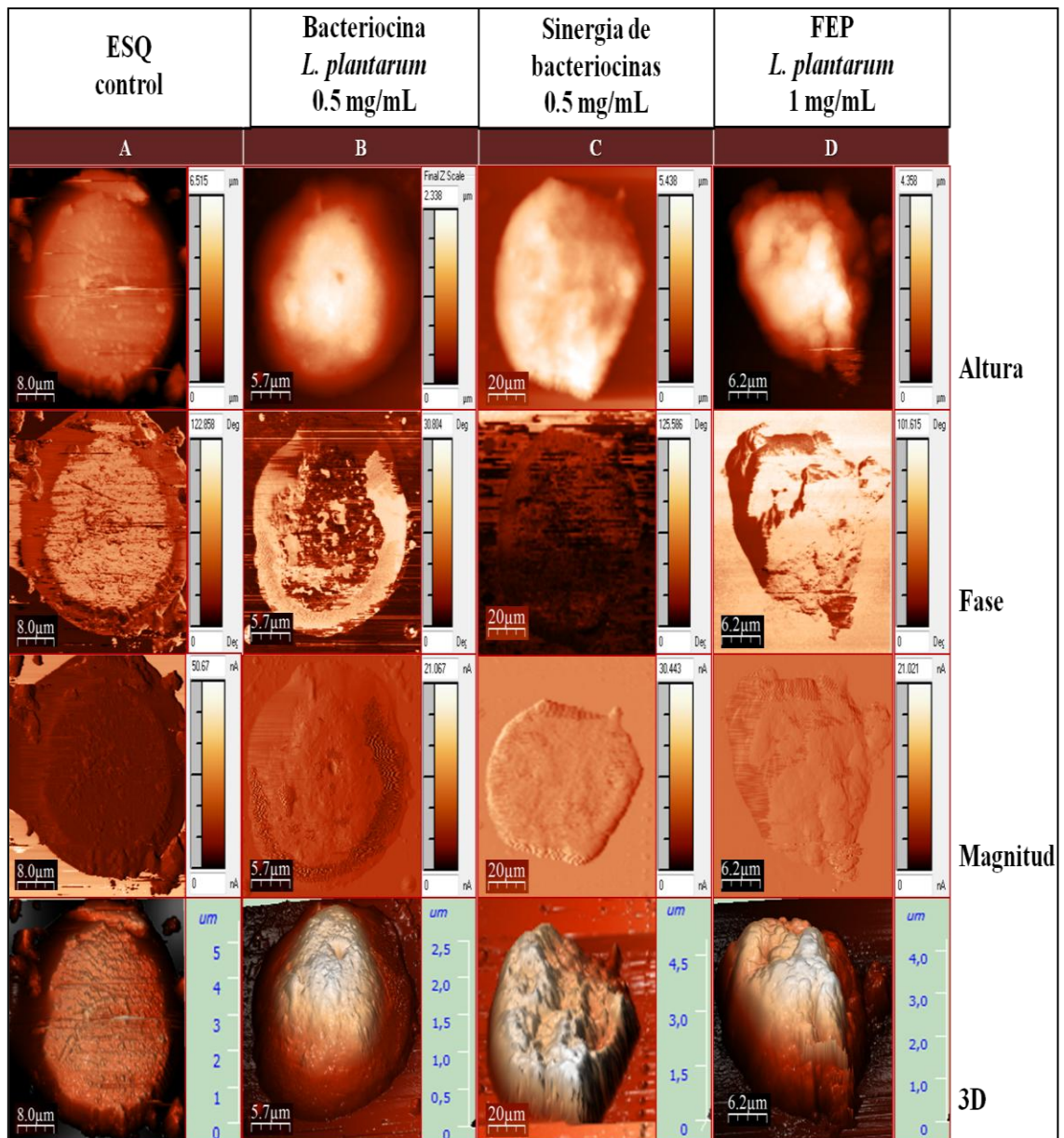
#### 8.6.4.2 Evaluación y actividad biológica de FEP y bacteriocinas sobre ESQ y su análisis morfológico

Se llevó a cabo la preparación de muestras de ESQ de *E. histolytica* obtenidos *in vitro* bajo diferentes tratamientos y se observaron al MFA por el modo semi-contacto. En la Figura 37 se observan los aspectos morfológicos de la pared celular de las ESQ. En la columna A se observa una ESQ control sin tratamiento, a los 6 días de incubación, donde se muestra una célula más redondeada en comparación con las ESQ con tratamientos de bacteriocinas y FEP. Presenta una fase de  $100^\circ$  y magnitud de 45nA (imagen con medidas no mostradas). La imagen en 3D nos muestra una pared celular rugosa y gruesa y presenta una altura máxima de 6.515 $\mu$ m, estas muestras presentan mayor altura que las ESQ obtenidas de los tratamientos de bacteriocinas de *L. plantarum* a 0.5 mg/mL, sinergia de bacteriocinas a 0.5 mg/mL y FEP *L. plantarum* a 1 mg/mL obteniendo una altura máxima de 2.338, 5.438 y 4.358  $\mu$ m respectivamente, observando que las ESQ de menor altura fueron los que estuvieron en tratamiento con bacteriocinas de *L. plantarum* a 0.5 mg/mL.

El tratamiento con bacteriocinas de *L. plantarum* a 0.5 mg/mL (columna B) mostró una hendidura semejante a poro (imagen en 3D) en la superficie de la pared celular de ESQ. Se observa una mayor intensidad de claridad en la parte más superior de la célula, lo cual indica que tiene más altura en esa zona (imagen de altura). Además, tiene una fase de  $180^\circ$  y una magnitud de 30 nA (imagen con medidas no mostradas). La columna C, que corresponde al tratamiento de sinergia de bacteriocinas a 0.5 mg/mL, muestra una ESQ con mayor altura en comparación con las demás células en tratamiento. La fase se presenta en  $100^\circ$  y 30 nA de magnitud (imagen con medidas no mostradas).

La imagen en 3D muestra una ESQ control de morfología esférica de aproximadamente 25  $\mu$ m de diámetro, y una altura máxima de 5  $\mu$ m y se observa una pared celular rugosa e irregular.

En la imagen en 3D en la columna BCD se muestran las micrografías de las ESQ obtenidas de los tratamientos *L. plantarum* a 0.5 mg/mL, sinergia de bacteriocinas a 0.5 mg/mL y FEP de *L. plantarum* a 1 mg/mL, se aprecia que la ESQ obtenida con bacteriocinas son estructuras pequeñas con respecto al control y a los tratamientos, pero en los subsiguientes tratamientos (C y D) se observan estructuras o vestigios celulares no esféricos y con topografía muy irregular.



**Fig. 37.** Aspecto de ESQ de *E. histolytica* observados al MFA por el modo semi-contacto. A) ESQ de un cultivo normal sin tratamiento. B) con tratamiento de bacteriocina de *L. plantarum* a 0.5 mg/mL. C) con tratamiento de sinergia de bacteriocinas (*L. plantarum*+*L. casei*) a 0.5 mg/mL. D) con tratamiento de FE de *L. plantarum* a 1 mg/mL.

En la Figura 38 se observa la topografía de la pared celular de ESQ de *E. histolytica* observados al MFA por el modo semi-contacto. El acercamiento a la pared celular de ESQ mostró diferencias en la morfología de las estructuras.

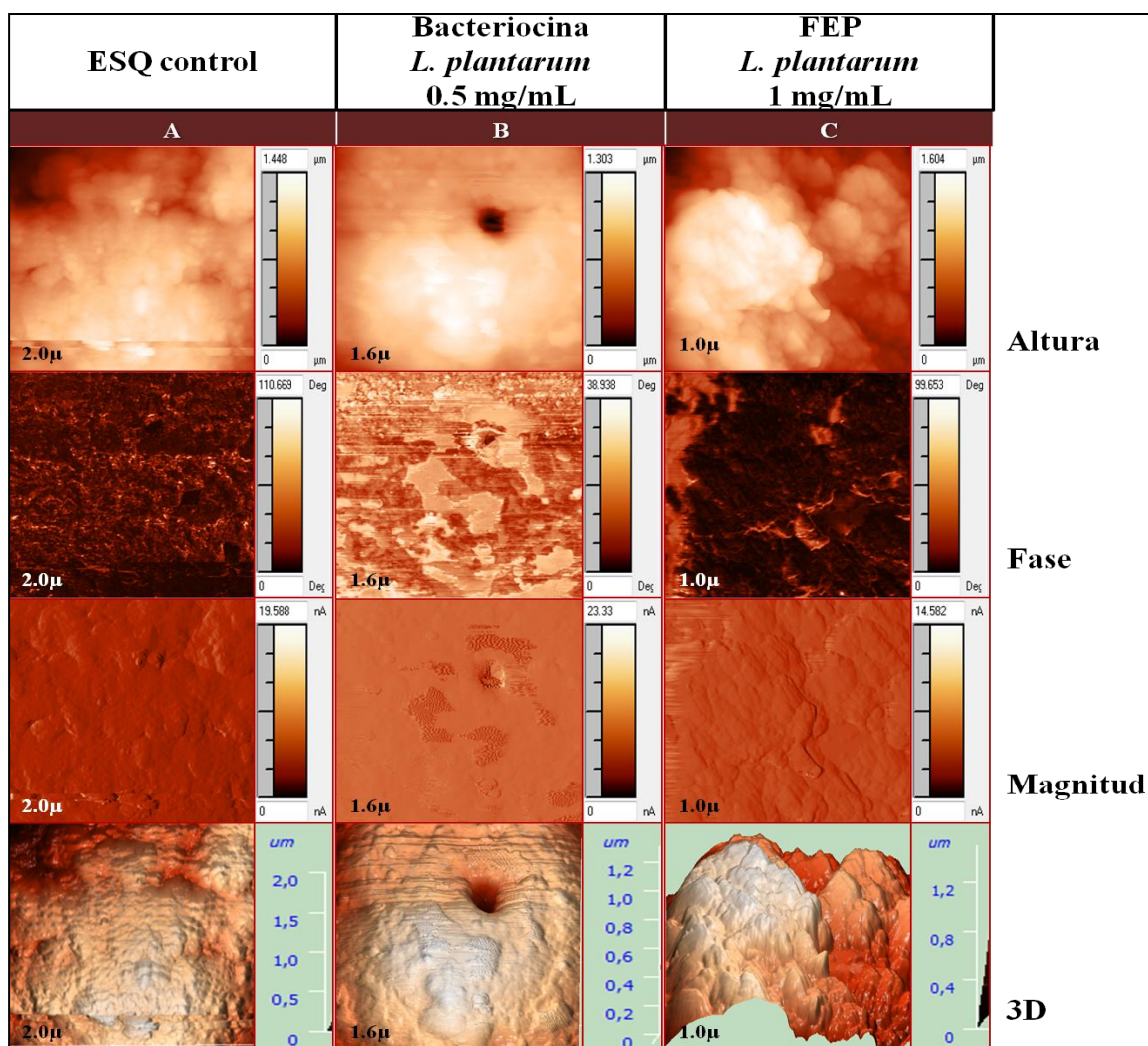
Las imágenes de altura se presentan muy similares. Las ESQ control y el tratamiento de bacteriocinas de *L. plantarum* a 0.5 mg/mL presentaron la misma fase de 180° pero con diferente magnitud, de 20 y 25 nA respectivamente. La imagen en 3D de la columna A, muestra la rugosidad e irregularidad de una ESQ control sin tratamiento.

En la imagen de altura de la columna B que es el tratamiento de bacteriocinas de *L. plantarum* a 0.5 mg/mL, muestra una zona más profunda, lo cual representa una hendidura que se asemeja a un poro (imagen en 3D), esto es característico de las propiedades de las bacteriocinas. La pared celular de las ESQ se observan con rugosidad e irregulares.

El tratamiento que mostró mayor cambio morfológico de las ESQ fue el FE de *L. plantarum* 1 mg/mL (columna C). La imagen de altura mostró diferencias en alturas entre una zona y otra de la misma célula. Además de presentar una menor fase de 150° y de 24 nA de magnitud.

En la imagen en 3D se aprecian mayores elevaciones y depresiones en la ESQ. Además se observa una pared celular con gran rugosidad e irregular. Este tratamiento fue el que presentó mayor cambio morfológico en comparación con las ESQ control y el tratamiento de bacteriocinas de *L. plantarum* a 0.5 mg/mL.





**Fig.38.** Aspecto de rugosidad de la pared celular de ESQ de *E. histolytica* observados a MFA por el modo semi-contacto. A) ESQ de un cultivo normal sin tratamiento. B) con tratamiento de bacteriocina de *L. plantarum* a 0.5 mg/mL. c) con tratamiento de FE de *L. plantarum* a 1 mg/mL.

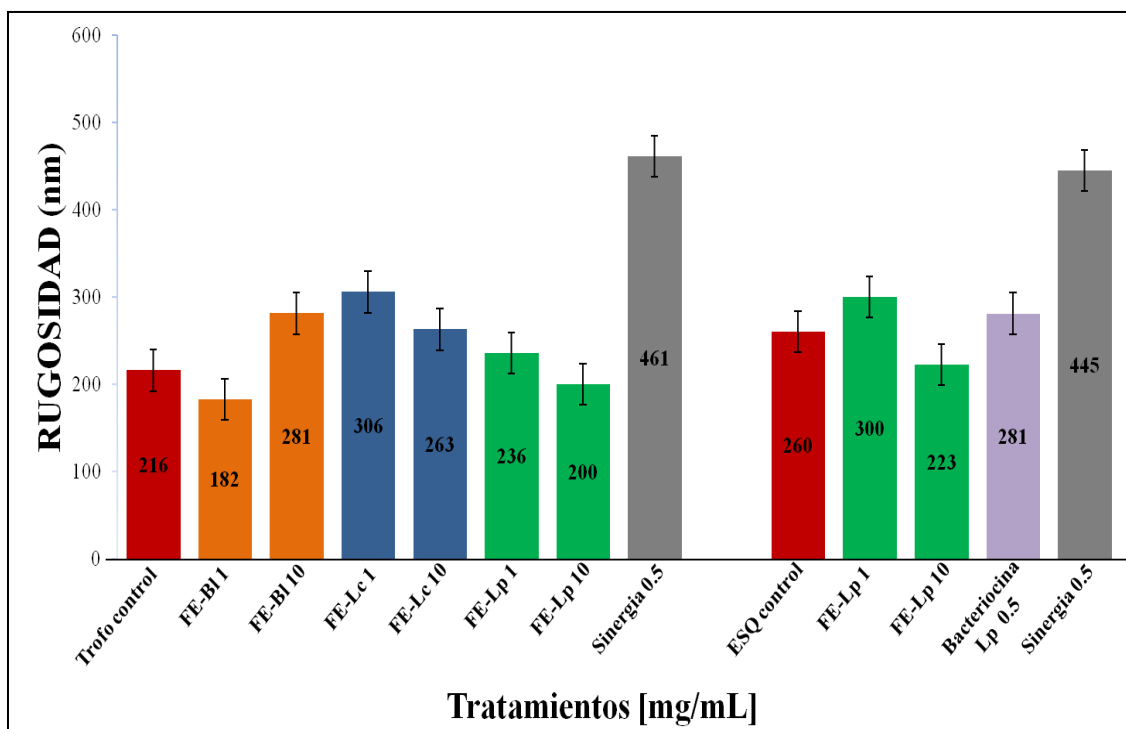
Por otra parte, se llevó a cabo el análisis de los cambios morfológicos de rugosidad (Fig. 39), altura (Fig. 41), ancho (Fig. 42) y longitud (Fig. 43) de las muestras tanto para trofozoíto como ESQ mediante los software NOVA versión 1.1.0.1921 y WSxM v5.0 Develop 8.0 y para el análisis de volumen (Fig. 40) para ambos estadios se utilizó el algoritmo Matlab R2012b.

En la Figura 39 se muestra la comparación de rugosidades de trofozoítos y ESQ de *E. histolytica* cultivados en presencia de liofilizado de bacteriocinas y FEP a diferentes concentraciones.



Se observa mayor rugosidad en los trofozoítos con tratamientos con FE de *B. longum* a 10 mg/mL, *L. casei* a 1 y 10 mg/mL y *L. plantarum* a 1 mg/mL con respecto al control. Sin embargo, los tratamientos con FE de *B. longum* a 1 mg/mL y *L. plantarum* a 10 mg/mL mostraron menor rugosidad comparado con el control.

En las ESQ se muestra una tendencia de mayor rugosidad de los tratamientos de FE de *L. plantarum* a 1 mg/mL y la bacteriocina de esta a 0.5 mg/mL con respecto al control. Solo el tratamiento con FE de *L. plantarum* a 10 mg/mL mostró una rugosidad inferior a las ESQ control. En ambos estadios, el tratamiento con la sinergia de bacteriocinas (*L. plantarum*+*L. casei*) a 0.5 mg/mL mostró la mayor rugosidad en comparación con todos los demás tratamientos y los controles.



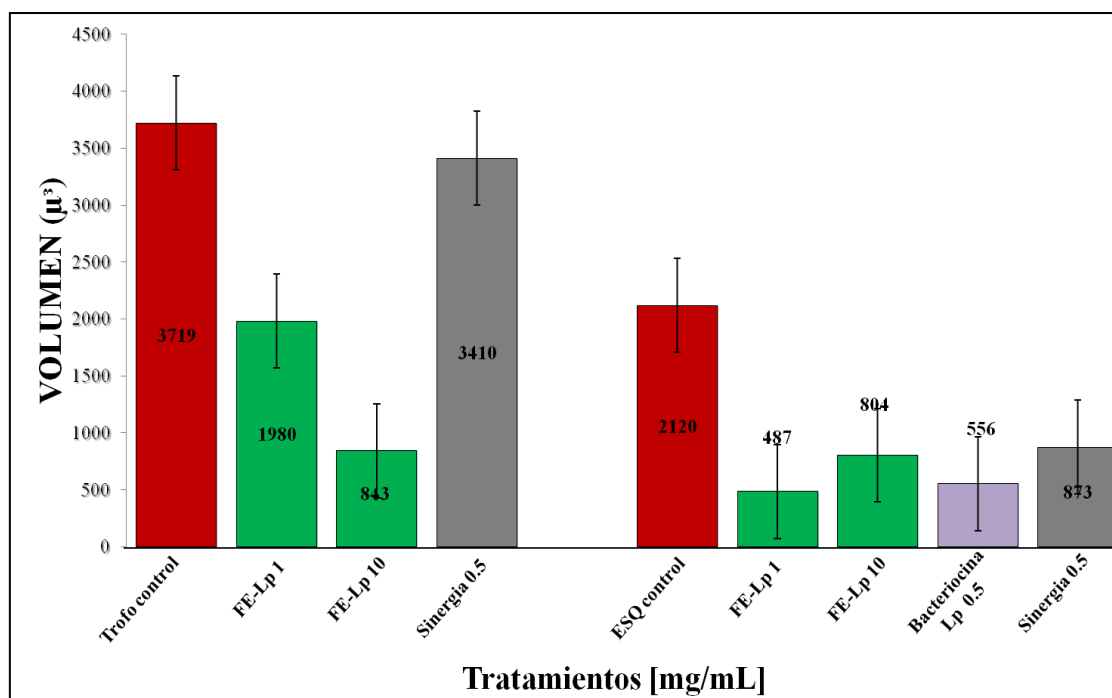
**Fig. 39. Gráfico de rugosidades de trofozoítos y ESQ de *E. histolytica* en presencia de bacteriocinas y FEP.** Comparación de rugosidades de trofozoítos cultivados en presencia de FE de *B. longum*, *L. casei* y *L. plantarum* a 1 y 10 mg/mL; sinergia de bacteriocinas a 0.5 mg/mL. ESQ cultivados en presencia de FE de *L. plantarum* a 1 y 10 mg/mL; bacteriocina de *L. plantarum* a 0.5 mg/mL y sinergia de bacteriocinas a 0.5 mg/mL.

En la Figura 40 se observa la comparación de volúmenes de trofozoítos y ESQ de *E. histolytica* cultivados en presencia de liofilizado de bacteriocinas y FEP a diferentes concentraciones.

Se observa que los trofozoítos muestran una mayor disminución en volumen con los tratamientos de FE *L. plantarum* de 1 y 10 mg/mL con respecto al control, aunque la concentración de 10 mg/mL fue el que presentó la mayor disminución en el volumen de las células con respecto a los demás tratamientos. En cuanto al tratamiento con la sinergia (*L. plantarum* + *L. casei*) mostró que no existe diferencia significativa con respecto al control.

Por el contrario, las ESQ muestran mayor diferencia significativa de todos los tratamientos con respecto al control. El tratamiento de FE *L. plantarum* de 1 mg/mL fue el que presentó mayor diferencia significativa con respecto a todos los demás tratamientos.

Los resultados obtenidos mediante el algoritmo Matlab R2012b mostraron que existe mayor tendencia de disminución del volumen de las ESQ por parte de los tratamientos con FEP y bacteriocinas en comparación con los trofozoítos.



**Fig. 40. Gráfico de volúmenes de trofozoítos y ESQ de *E. histolytica* en presencia de bacteriocinas y FEP.** Comparación de volúmenes de trofozoítos cultivados en presencia de FE de *L. plantarum* a 1 y 10 mg/mL; sinergia de bacteriocinas a 0.5 mg/mL. ESQ cultivados en presencia de FE de *L. plantarum* a 1 y 10 mg/mL; bacteriocina de *L. plantarum* a 0.5 mg/mL y sinergia de bacteriocinas a 0.5 mg/mL.

En las figuras 41, 42 y 43 se muestra el análisis de los cambios morfológicos tanto de trofozoítos como de ESQ tales como altura, ancho y longitud respectivamente mediante los software NOVA versión 1.1.0.1921 y WSxM v5.0 Develop 8.0

En el gráfico comparativo de alturas (Figura 41) se observa que los trofozoítos bajo los tratamientos de FE de *B. longum* a 10 mg/mL, *L. casei* a 1 y 10 mg/mL, *L. plantarum* a 1 y 10 mg/mL y la sinergia de bacteriocinas (*L. plantarum* + *L. casei*) a 0.5 mg/mL presentaron mayores alturas con respecto al control. En cambio los trofozoítos en presencia del tratamiento con *B. longum* a 1 mg/mL no presenta diferencia significativa con respecto al control.

En las ESQ, el único tratamiento que tuvo una diferencia significativa con respecto al control y los demás tratamientos fue la sinergia de bacteriocinas (*L. plantarum*+*L. casei*) a 0.5 mg/mL ya que aumentó el doble de la altura de las ESQ con respecto al control. Los tratamientos con FE de *L. plantarum* a 1 y 10 mg/mL y la bacteriocina de esta cepa a 0.5 mg/mL se mantuvieron en la misma altura con respecto a las ESQ control.

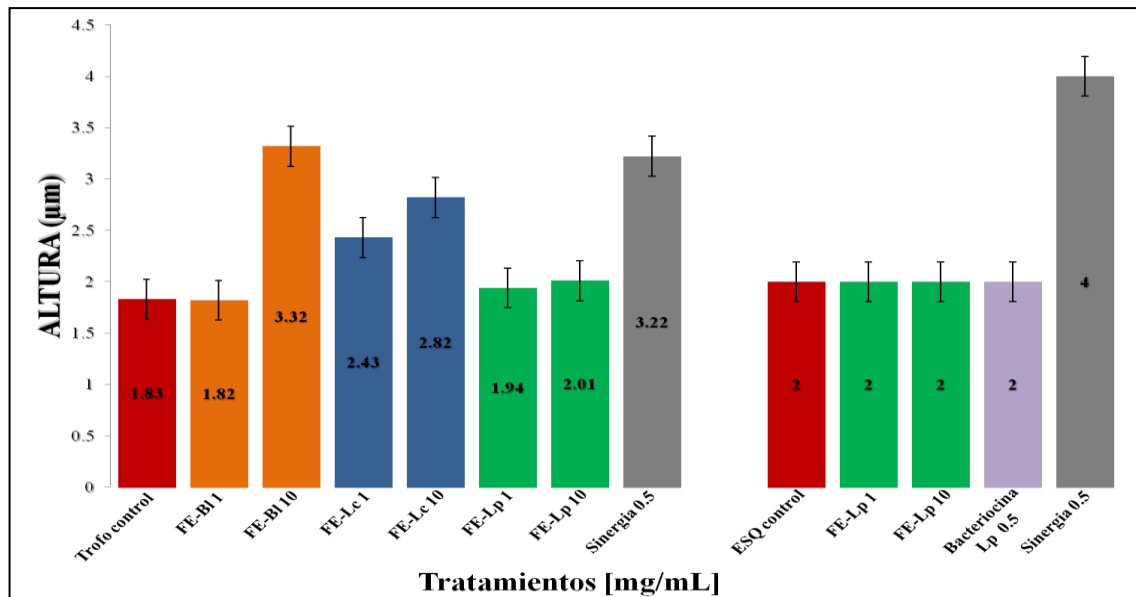
En cuanto al ancho de trofozoítos y ESQ, en el gráfico (Figura 42) se observa que en ambos estadios se disminuyó significativamente el ancho de las células con respecto a sus controles respectivos. Aunque los trofozoítos bajo el tratamiento con FE de *L. plantarum* a 10 mg/mL fueron los que presentaron la mayor disminución de anchura con respecto a los demás tratamientos. Las ESQ en presencia de FE de *L. plantarum* a 1 y 10 mg/mL y la bacteriocina de esta cepa a 0.5 mg/mL no mostraron diferencia significativa entre ellas mismas.

En la Figura 43 se observa que existe una disminución en cuanto a la longitud de los trofozoítos bajo los tratamientos con FEP y la sinergia de bacteriocinas.

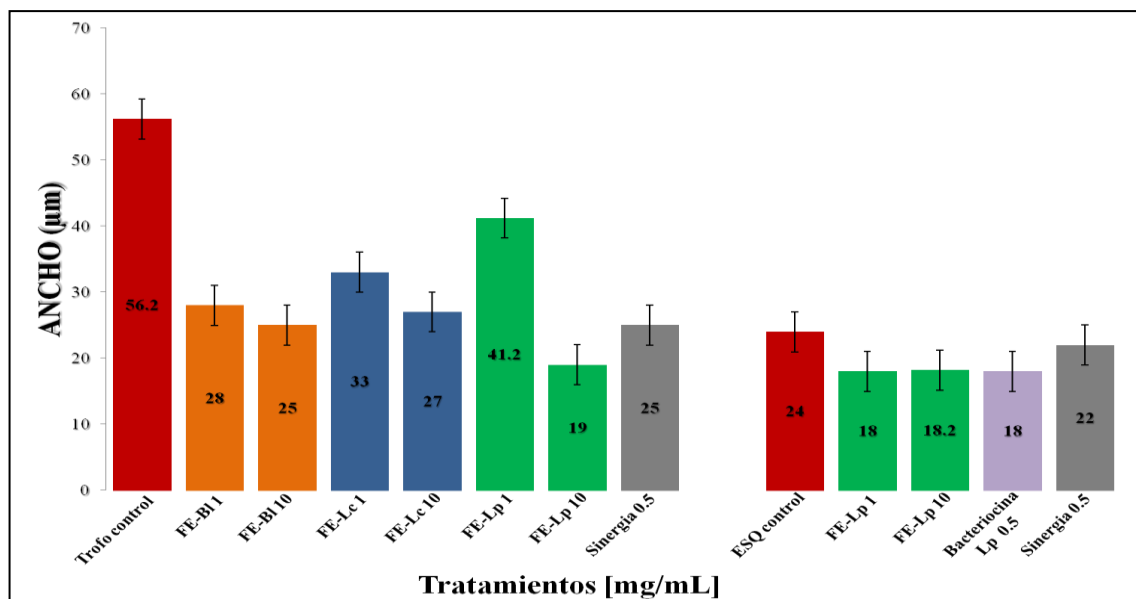
Sin embargo, las longitudes de los trofozoítos cultivados en presencia del tratamiento con FE de *B. longum* 1 mg/mL y con la sinergia de bacteriocinas

(*L. plantarum*+*L. casei*) a 0.5 mg/mL mostraron la mayor diferencia significativa con respecto al control y los tratamientos.

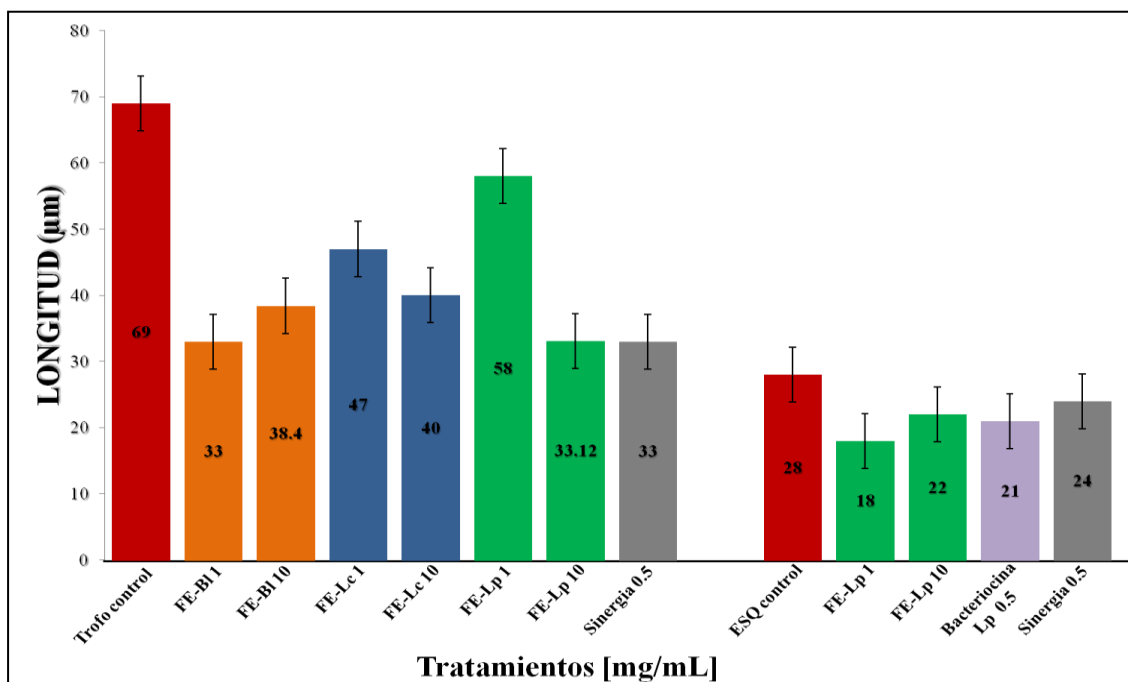
En las ESQ se observó disminución en su longitud en presencia de todos los tratamientos con respecto al control. El tratamiento con FE de *L. plantarum* a 1 mg/mL tuvo la mayor diferencia significativa con respecto a todos los tratamientos.



**Figura 41.** Gráfico de medidas de alturas de trofozoítos y ESQ de *E. histolytica* en presencia de bacteriocinas y FEP. Comparación de las alturas de trofozoítos y ESQ de *E. histolytica* cultivados en presencia de liofilizado de bacteriocinas y FEP a diferentes concentraciones.



**Figura 42.** Gráfico de medidas de ancho de trofozoítos y ESQ de *E. histolytica* en presencia de bacteriocinas y FEP. Comparación de las anchuras de trofozoítos y ESQ de *E. histolytica* cultivados en presencia de liofilizado de bacteriocinas y FEP a diferentes concentraciones.



**Figura 43.** Gráfico de medidas de longitudes de trofozoitos y ESQ de *E. histolytica* en presencia de bacteriocinas y FEP. Comparación de las longitudes de trofozoitos y ESQ de *E. histolytica* cultivados en presencia de liofilizado de bacteriocinas y FEP a diferentes concentraciones.

**Tabla VIII**

Análisis de características nanomécánicas de *E. histolytica*

Datos cuantitativos de parámetros	Trofozoito control	FEP vs trofozoito		Sinergia vs trofozoito	ESQ control	FEP vs ESQ		Sinergia vs ESQ
		Lp 1 mg/mL	Lp 10 mg/mL			Lp 1 mg/mL	Lp 10 mg/mL	
Volumen (μm <sup>3</sup> )	3719.3	1980	843	3410	2120	486.77	804	873
Rugosidad (nm)	216	236	200	461	260	300	223	445
Altura (μm)	1.83	1.94	2.01	3.22	2	2	2	4
Ancho (μm)	56.2	41.2	19	25	24	18	18.2	22
Longitud (μm)	69	58	33.12	33	28	18	22	24

## 9. DISCUSIÓN

La amibiasis es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la infección provocada por *E. histolytica* con o sin manifestaciones clínicas. Este parásito protozoo tiene una distribución cosmopolita y especialmente una prevalencia alta en países donde predominan condiciones socioeconómicas y sanitarias pobres. Según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía, la amibiasis intestinal ocupó el séptimo lugar como causa de morbilidad por casos nuevos en México en el 2008. En México se considera 16 millones de portadores, 1.3 millones de enfermos y 10 mil a 30 mil muertes por año. En base a estos datos, puede afirmarse que la amibiasis se encuentra entre las primeras causas de morbimortalidad en el país (Gutiérrez y Muñoz, 1994; Martínez, 1987).

*E. histolytica* posee dentro de su ciclo de vida dos formas: la fase móvil e infestiva denominada **trofozoíto** y una estructura de latencia o de resistencia cubierta con una pared de quitina formada por enlaces  $\beta$ -1-4 n-acetilglucosamina con función de protección, llamada **quiste**. La droga de elección para el tratamiento de la amibiasis y sus múltiples manifestaciones clínicas es el metronidazol, sin embargo presenta efectos secundarios indeseables en el humano y además existen reportes recientes de que algunas cepas de *E. histolytica* presentan resistencia a esta droga (Barrón, 2007).

Debido a la importancia médica que posee esta enfermedad, se ha vuelto necesario tener un mayor entendimiento del parásito y su interacción con diferentes compuestos químicos y/o naturales, en busca de compuestos que inhiban el proceso de infestación (fase de trofozoíto), o bien inhiban la inducción de la formación del quiste, la cual es considerada la fase de resistencia.

Recientes trabajos se han realizado para observar la capacidad amebicida de ciertos extractos de plantas tales como *Castela texana* sobre el crecimiento y enquistamiento de *E. invadens* (Calzado *et al.*, 2007), en los cuales se ha reportado su capacidad significativa para inhibir el estadio trofozoíto así como el proceso de enquistamiento de *E. invadens* y de *E. histolytica*.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo existe mayor diferencia significativa al utilizar el tratamiento de los Factores Extracelulares de *L. plantarum* con respecto al control, ya que se presentó una mayor inhibición tanto de la fase de trofozoíto como de ESQ. Por otra parte, se han realizado investigaciones empleando las BAL, algunas de las cuales se les considera probióticos, y una de las características de los metabolitos extracelulares de los probióticos es que poseen la capacidad de inhibir un amplio rango de microorganismos de importancia alimentaria y médica, como es el caso de *E. histolytica*.

Se han realizado estudios utilizando liofilizado de medios condicionados de *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus* y *B. longum* sobre la línea celular HT29 donde se muestra inhibición del crecimiento de las células tumorales por parte de todas las cepas (Mendoza, 2014).

En el caso de las amibas, se han realizado trabajos en los cuales se evaluó la inhibición de *E. histolytica* en el estadio trofozoíto por parte del liofilizado de medios condicionados de *L. plantarum*, *L. casei rhamnosus* y *B. longum* los cuales sugieren que existen algunas sustancias con actividad antiamibiana debido a que muestran una clara tendencia a la inhibición del crecimiento de *E. histolytica* (Barrón *et al.*, 2008).

En el estadio de quiste existen pocos trabajos en los cuales se aborde la búsqueda de su inhibición empleando BAL, entre los cuales destaca, la utilización del liofilizado del medio condicionado con *Lactococcus lactis* donde se observa hasta el 93% de la inhibición del enquistamiento de *E. histolytica* (Barrón *et al.*, 2012).

Se ha empleado liofilizado de metabolitos de *B. longum* obtenidos del medio condicionado con glucosa y sacarosa, con el propósito de comparar la actividad biológica de los factores extracelulares de *B. longum* cultivada en presencia de diversas fuentes de carbono. Los resultados mostraron la actividad biológica inhibitoria de los metabolitos obtenidos del cultivo de *B. longum* sobre el estadio quiste y trofozoíto de *E. histolytica*, los cuales pueden ser atribuidos a la actividad de las bacteriocinas (Sáenz, 2013).

En la búsqueda de alternativas terapéuticas para la amibiasis, recientemente se ha trabajado con las bacteriocinas, las cuales constituyen un grupo heterogéneo de péptidos que presentan una gran variedad de características fisicoquímicas y espectros de acción antimicrobiana, sin embargo la mayoría de las investigaciones están enfocadas a infecciones de origen bacteriano, no así para las afecciones de origen parasitario.

En el presente trabajo, los bioensayos realizados con el tratamiento de sinergia de bacteriocinas de *L. plantarum* y *L. casei* y la Nisina (bacteriocina comercial) mostraron mayor inhibición tanto en trofozoítos como ESQ de *E. histolytica*, en comparación con los demás tratamientos. De acuerdo a la literatura, la actividad bactericida de las bacteriocinas puede estar acompañada por lisis de células, como es el caso de la nisina A, la cual actúa desestabilizando o permeabilizando la membrana citoplasmática (Varo, 2010).

Por otra parte, en función a la capacidad de inhibición por parte de las bacteriocinas se procedió a la caracterización bioquímica parcial de las mismas, obteniendo en el análisis electroforético de los liofilizados de bacteriocinas un peso molecular de las proteínas de aproximadamente 10 kDa.

En la actualidad se han reportado compuestos proteicos obtenidos a partir de probióticos, los cuales presentan una gran gama de efectos benéficos para la salud de los humanos y tienen aplicaciones en la industria alimenticia, inhibición en el metabolismo, entre otros.



Estos resultados nos ayudan a considerar el uso de bacteriocinas como una alternativa terapéutica contra la amibiasis y así mismo, disminuir el consumo de metronidazol, el cual genera efectos secundarios indeseables en los pacientes.

Existen otros estudios acerca de bacteriocinas donde se ha determinado la fuente de carbono que proporciona el mejor rendimiento celular de *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. casei rhamnosus* para obtener los medios condicionados con cada una de las bacterias probióticas y se comparó la actividad de interferencia microbiana que exhibió cada medio condicionado sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *E. histolytica*; y en función del potencial amebicida se procedió a la caracterización bioquímica parcial de los metabolitos presentes en el medio condicionado. *L. acidophilus* demostró una interferencia microbiana del 96.49% sobre el crecimiento de *E. histolytica* HM1-IMSS y la obtención de proteína con un peso molecular de 71 kDa. Estudios anteriores han demostrado que las bacteriocinas son las responsables de la interferencia microbiana. En el medio condicionado de *L. acidophilus*, existe la presencia de grasas y ácido láctico, que pueden estar actuando sobre el crecimiento de *E. histolytica* (Mireles, 2015).

Tradicionalmente, para observar diversas características típicas de los estadios de trofozoíto o quiste se emplean diversas tinciones específicas y para realizar las observaciones de dicho material biológico, se emplea el microscopio óptico o bien microscopio de fluorescencia; en el caso de observar la estructura interna se ha empleado principalmente el microscopio electrónico de transmisión y para realizar la observación topológica de la célula se emplea el microscopio de barrido (León, 2012). Sin embargo, en la actualidad se pueden realizar análisis de espectrometría de dichas células empleando nuevas herramientas microscópicas, como el microscopio de fuerza atómica (MFA o AFM por sus siglas en inglés).

Recientemente se ha realizado estudios de MFA con *Helicobacter pylori* cultivados en presencia del extracto metanólico de *Stenocereus marginatus* donde se mostró cambios significativos en longitud, altura, ancho, volumen y rugosidad.

En cuanto al biofilm, característico del cultivo de *H. pylori*, se analizó al MFA llegando a determinar por primera vez que está organizado en vesículas de diverso volumen y a las cuales se determinó características morfométricas (Martínez, 2014).

Estudios de *E. histolytica* donde se han descrito algunos aspectos de la formación de la pared celular quística, así como cambios estructurales que presenta la célula a lo largo de su enquistamiento mediante imágenes de estructuras quísticas producidas *in vitro* mediante el método de alta tensión de CO<sub>2</sub>, fijadas en glutaraldehído al 2.5% en diferentes tiempos de diferenciación celular y observadas a través de MEB, MF, MO y MFA. Los resultados obtenidos en dichos estudios mostraron diferencia entre los estadios que *E. histolytica* presenta en su proceso de diferenciación celular; se evidencia con detalle las diferencias en topología, elasticidad, composición, estructura, rugosidad y tamaño; así como también la aparición de microfibrillas en la superficie externa de la célula, lo cual evidencia la formación de una pared celular (León, 2012).

En el presente estudio, los análisis realizados a MF mostraron que los FEP tienden a dañar la cubierta de quitina de ESQ, ya que muestran una menor intensidad de fluorescencia comparado con ESQ controles. De la misma manera los tratamientos con la sinergia de las bacteriocinas mostraron una menor intensidad de fluorescencia. En cuanto la MEB mostró aspectos irregulares, con depresiones y protuberancias de las superficies de trofozoítos y las rugosidades de ESQ.

Por otra parte, los resultados obtenidos del análisis que se realizó mediante MFA mostraron que la morfología de los trofozoítos y ESQ de un cultivo normal tienen diferente tamaño y altura con respecto a células cultivadas en tratamiento. Un aspecto importante que se observó es que el tratamiento con bacteriocinas produjo hendiduras semejantes a poros en las superficies de las membranas y paredes celulares tanto de trofozoíto como de ESQ, respectivamente. Además de que provocó la mayor disminución en tamaño y forma de las células con respecto a los demás tratamientos.

Esto coincide en una de las propiedades que poseen las bacteriocinas, ya que éstas originan alteraciones celulares en las células sensibles de acuerdo con cada tipo de bacteriocina. De las dos bacteriocinas mejor conocidas, la nisina se sabe que actúa como despolarizante de las membranas bacterianas energizadas produciendo poros en la membrana lipídica.

También se presentaron algunos problemas en cuanto al escaneo de las alturas de las células, los trofozoítos controles fueron demasiado altos para que el equipo diera una correcta lectura de las células. Además que requiere de condiciones adecuadas para hacer el escaneo y análisis de células puesto que cualquier ruido externo era capaz de dar imágenes no óptimas para una correcta lectura de alturas y dimensiones de las mismas. Por otra parte, se sugiere disminuir la concentración de glutaraldehído para la fijación de células ya que puede modificar propiedades de membrana porque las células quedan recubiertas. Por esta razón se realizaron varios lavados de las células con agua desionizada para disminuir la cantidad de glutaraldehído en las muestras y obtener una mejor observación de las mismas.

Es por esto que se realizó un análisis de trofozoítos fijados a diferentes concentraciones de glutaraldehído (sin glutaraldehído, al 0.05% y al 2.5%) para observar la morfología de los mismos. En donde se apreció un mejor escaneo de las células y una morfología pleomórfica típica de trofozoítos de *E. histolytica*. Lo cual sugiere que a nula o menor concentración de glutaraldehído se puede realizar un mejor análisis y observación de trofozoítos de *E. histolytica* mediante MFA. Estos resultados nos permitirán en un futuro adaptar una metodología con condiciones óptimas adecuadas para el análisis de *E. histolytica*.

Existe un estudio reciente que involucra Microscopía Electrónica, de Fuerza Atómica y Confocal donde compararon el proceso de adhesión de *E. histolytica* y *E. dispar* a fibronectina. Los resultados mostraron que la adhesión de *E. histolytica* a fibronectina involucra una reorganización de la red de actina que resulta en el contacto y degradación focal de matriz celular de la fibronectina.

En contraste con *E. dispar* que no mostró estas regiones de adhesión focal. Además el análisis de MFA mostró diferencias en el sitio de contacto de ambas amibas con el sustrato. Estos resultados mostraron que existen diferencias entre los procesos de adhesión de ambas especies, lo cual es relevante para el entendimiento del carácter invasivo de *E. histolytica* (Talamás *et al.*, 2015).

Actualmente, el MFA es una herramienta con capacidad de observar estructuras a resolución nanométrica y con la opción de analizar las propiedades físicas y mecánicas de los materiales a esta escala, permitiendo así el estudio de material biológico (Tapia, 2009). Esto se logra mediante la interacción local entre la punta y la superficie de una muestra, lo cual proporciona imágenes tridimensionales de superficies con alta resolución espacial en tiempo real. Debido a esto, es utilizado en la caracterización de materiales para determinar sus propiedades.

La elasticidad es una propiedad mecánica que indica la capacidad del material para recuperar sus dimensiones originales después de retirar las cargas que se produjeron en él mediante deformaciones. Cuando un cuerpo deformable se somete a una carga externa, se genera una respuesta del material, que en general se visualiza mediante una deformación. En general, la deformación se establece al medir cuánto se deforma el material al aplicar una fuerza conocida o cuantificar la fuerza que se requiere para deformarlo.

Una de las técnicas que permite determinar algunas propiedades mecánicas como la dureza, elasticidad, plasticidad y resistencia a la fatiga, es la indentación. A partir de ensayos de indentación es posible obtener diagramas de esfuerzo-deformación que convencionalmente son empleados para obtener datos sobre la resistencia a la tensión (o compresión, en el caso de la indentación), permitiendo a partir de los diagramas conocer los coeficientes de la ecuación constitutiva que caracteriza el comportamiento mecánico del material (Isaza, 2013).

En el presente estudio, el análisis realizado mediante indentaciones mostró que las ESQ control presentan una profundidad de indentación de 1.034  $\mu\text{m}$  mientras que los trofozoítos control son de 1.211  $\mu\text{m}$ . Por otro lado, las ESQ en presencia del tratamiento de FE de *L. plantarum* a 10 mg/mL y la sinergia de bacteriocinas a 0.5 mg/mL mostraron una profundidad de indentación de 501 y 660 nm respectivamente (ver anexo II). Esto indica que las ESQ en presencia de los tratamientos provocaron un cambio en la rigidez de la pared celular. De acuerdo a la literatura, menciona que la membrana celular es un cuerpo elástico de pequeño espesor y escasa rigidez flexional que sólo puede resistir tensiones de tracción. En cambio, un sustrato más rígido será menos deformable (Isaza, 2013).

El cálculo indirecto realizado para el módulo de elasticidad, con el fin de caracterizar la rigidez de la membrana, podría ser reemplazado por un ensayo de microdureza por indentaciones, el cual proporciona el módulo de Young directamente y por lo tanto con menos probabilidades de error (González *et al.*, 2003).

Investigaciones clásicas en propiedades mecánicas de tejidos biológicos blandos, encuentran como dificultad la imposibilidad para cuantificar los cambios en las propiedades elásticas durante la preparación o incisión del tejido estudiado.

## 10. CONCLUSIONES

- El tratamiento con Factores Extracelulares (FE) de *L. plantarum* a 10 mg/mL inhibe el crecimiento y la formación de estructuras semejantes a quistes (ESQ) de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS bajo condiciones axénicas *in vitro*.
- La sinergia de bacteriocinas (*L. plantarum* + *L. casei*) a 0.5 mg/mL inhibe el crecimiento y la formación de estructuras semejantes a quistes (ESQ) de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS bajo condiciones axénicas *in vitro*.
- El análisis nanomecánico de trofozoítos y ESQ al microscopio de fuerza atómica sometidos a los factores extracelulares de *L. plantarum* y bacteriocinas indica que estas células disminuyen su volumen (largo, ancho y altura) con respecto al control.
- El análisis nanomecánico de trofozoítos y ESQ al microscopio de fuerza atómica sometidos a los factores extracelulares de *L. plantarum* y bacteriocinas indica que estas células disminuyen presentan mayor rugosidad con respecto al control.

## 11. PERSPECTIVAS

- De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se recomienda continuar con estudios sobre el efecto que la presión osmótica ejerce sobre las células a una concentración de 50 mg/mL para descartar que dicho factor provoque la lisis celular.
- Por otra parte, como el tratamiento con las sinergias de bacteriocinas resultó con mayores porcentajes de inhibición, es recomendable seguir el análisis de la mezcla de las bacteriocinas para obtener una mejor caracterización bioquímica de éstas.
- Una de las ventajas del MFA es la posibilidad de visualización de células vivas *in situ*, lo que hace que sea una técnica muy útil para el estudio de la morfología celular. Por lo cual se recomienda que se adapte una metodología que integre la técnica del MFA con el cultivo celular de *E. histolytica* bajo condiciones óptimas que permita observar células *in vitro*.
- La prueba de indentación es un método que consiste en someter a deformación controlada un material cuyas propiedades mecánicas, como la elasticidad y la dureza, no se conocen. La dureza de un material puede ser evaluada de manera directa a partir de las características de la huella de indentación, como la profundidad o el área. En el presente trabajo se lograron obtener imágenes de indentación y de nanohuellas (ver anexo II), las cuales presentaron una profundidad aproximada de 1.211µm en la membrana celular de trofozoítos y de 1.034 µm en la pared celular de ESQ, por lo tanto se recomienda dicha metodología para evaluaciones futuras de las propiedades mecánicas de *E. histolytica* y otros microorganismos.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Amores R, Calvo A, Maestre JR, Martínez D. 2004. Prebióticos. Revista Española de Quimioterapia 17 (2): 131-139.
- Ayeh-Kumi PF. 2001. *Entamoeba histolytica*: genetic diversity of clinical isolates from Bangladesh as demonstrated by polymorphisms in the serine-rich gene. Experimental Parasitology 99:80-88. Doi: 10.1006/expr.2001.4652
- Babel FJ. 1977. Antibiosis by lactic cultures bacteria. Journal of Dairy Science 60: 815-821.
- Barrón M, Serrano G, Villarreal L, Mata B, Verduzco J, Morales M. 2006. Acción inhibitoria de probióticos sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica*. Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición-Universidad Autónoma de Nuevo León 7 (2): 31-37
- Barrón M. 2007. Inducción *in vitro* del ciclo de vida axénico de *Entamoeba histolytica* e inhibición de su diferenciación. Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Barrón M, Serrano GC, Morales M. 2008. Inhibición del crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* por acción de probióticos. Revista Ciencia-Universidad Autónoma de Nuevo León 11 (3): 1-7



- Barrón M, Mata B, Villarreal L, Morales ME, Morales M. 2012. Inhibición del enquistamiento de *Entamoeba histolytica* por *Lactococcus lactis*. Revista Mexicana Ciencias Farmacéuticas 43 (4): 31-37.
- Batrefoot SF, Klaanhammer TR. 1983. Detection of lactocin B, a bacteriocina produced by *Lactobacillus acidophilus*. Applied and Environmental Microbiology 45: 1808-1815.
- Calzado C, Verde J, Morales M, Segura JJ. 2007. Inhibición del proceso de enquistamiento de *E. invadens* por *Castela texana*. Revista Ciencia-Universidad Autónoma de Nuevo León 10: 44-48.
- Carr FJ, Don C, Nino M. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. Critical Reviews in Microbiology 28 (4): 281-370.
- Cavalier T. 1998. A revised six-kingdom system of life. Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society 73(3):203-266.
- Chávez B., Omaña M, González M, González A, Cedillo R. 2007. Ultrastructure of cyst differentiation in parasitic protozoa. Parasitology Research 100:1169-1175.
- Cintas L, Casaus MP, Herranz C, Nes IF, Hernández PE. 2001. Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. Food Science and Technology International 7 (4): 281-305.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe natural antimicrobial for food preservation. International Journal of Food Microbiology. 71(1):1-20.

Diamond LS. 1961. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. Science134: 336-337.

Diamond LS. 1961. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. Science134: 336-337.

F.A.O/O.M.S. 2002. Report of a joint FAO/WHO Working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food.

Farnworth ER. 2001. Probiotics and prebiotics. In: Handbook of Nutraceutical and functional foods (eds). CRC Press, pp.407-422.

Fernández E. 2009. Microbiología e inocuidad de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, pp. 30-33.

Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriot D, Ellis J, Harkness J. 2007. PCR detection of *E. histolytica*, *E. dispar* and *E. moshkovski* DNA in stool samples from Sydney, Australia. Journal of Clinical Microbiology 45:1035-1037.

Germano F, Bramanti E, Arcuri C, Cecchetti F, Cicciú M. 2013. Atomic force microscopy of bacteria from periodontal subgingival biofilm: preliminary study results. European Journal of Dentistry 7: 152-158.

Gómez J, Cortés J, Cuervo S, López M. 2007. Amebiasis intestinal. Revista de la Asociación Colombiana de Infectología. Infection 11(1): 36-45.

González R, Bernal R, Melo F. 2003. Caracterización de membranas de PDMS para el estudio de fuerzas de adhesión celular. Laboratorio de Física no Lineal, Departamento de Física, Universidad de Santiago de Chile.

- González M, Carabarin A, Baylon L, Rosales J. 2012. De amibas y amebiasis: *Entamoeba histolytica*. Elementos 87. pp. 13-18.
- Gratia A. 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la Société de Biologie 93: 1040-1041.
- Guerrero J. 2007. Amebiasis. Hospital infantil La Paz, Madrid. Web Pediátrica  
Disponibile en: <http://www.webpediatria.com/infopadres/pdf/amebiasis.pdf>
- Gutiérrez M. 2008. Amebiasis en España: diagnóstico molecular y estudio epidemiológico de una parasitosis emergente. ISBN: 978-84-692-0156-5. Tesis. Universidad complutense de Madrid.
- Gutiérrez G, Muñoz O. 1994. Epidemiología de la amibiasis. Kretschmer R, (ed) Amibiasis, infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Editorial Trillas.
- Guzmán E, Montes P, Monge E. 2012. Probióticos, prebióticos y simbióticos en el síndrome de intestino irritable. Acta Médica Peruana ISSN 1728-5917, [Online]. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S172859172012000200009&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S172859172012000200009&script=sci_arttext)
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2006-2008. Banco de información INEGI. [Online] Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/biinegi/>
- Isaza JA. 2013. Comportamiento mecánico de tejidos blandos tipo multicapa. Tesis. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Minas Medellín, Colombia.

- Jacob FL, Siminovitch A, Wollman E. 1953. Définition de quelques termes relatifs á la lysógenie. Instituto Pasteur, Paris 84: 222-224.
- Joshi N, Medina H, Barboza J. 2000. Estructura nanoimaging y ultra de *Entamoeba histolytica* y sus seudópodos mediante microscopio de fuerza atómica. Escaneado y Microscopías de Fuerza para Aplicaciones Biomédicas II. In: Nie S, Tamiya E, Yeung ES (eds). Proceedings of SPIE. 3922:222-227.
- Klaenhammer TR, Sutherland SM. 1980. Detection of plasmid deoxyribonucleic acid in an isolate of *Lactobacillus acidophilus*. Applied and Environmental Microbiology 39 (3): 671-674.
- Kretschmer R. 1994. Amibiasis. Infección y Enfermedad por *Entamoeba histolytica*. México: Ed. Trillas. 135-154.
- Lee YK, Salminen S. 1995. The coming of age of probiotics. Trends in Food Science & Technology 6: 241–245.
- León A. 2012. Morfogénesis de la pared celular y propiedades biofísicas de *Entamoeba histolytica* durante su diferenciación. Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Mancilla I. 2010. Búsqueda del dominio Tir en *Entamoeba histolytica* y su participación en el proceso de fagocitosis. Tesis. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.
- Martínez I. 2014. Actividad biológica *in vitro* de cuatro tratamientos sobre *Helicobacter pylori* y análisis morfométrico al microscopio de fuerza atómica. Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Martínez A. 1987. Las amibas, enemigos invisibles. Fondo de Cultura Económica, SEP. México, D.F. ISBN 968-16-2713-X, [Online]. Disponible en: <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/47/html/amibas.html>
- Menchaca J, Barrón M, León A, Ortega J, Vargas J, Hernández J, Morales M. 2014. *Entamoeba histolytica*: trophozoite, precyst and cyst studied by atomic force microscopy. Microscopy: advances in scientific research and education (A. Méndez-Vilas, Ed.) 1: 153-160.
- Mendoza P. 2014. Evaluación de la actividad biológica de *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* y *L. plantarum* contra la línea celular de cáncer de colon HT29. Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Mireles C. 2015. Determinación bioquímica del medio condicionado con *Lactobacillus* sp. que presentan actividad de interferencia microbiana contra *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Montalvo C. 2010. Microscopía. [Online]. Disponible en: [http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/2\\_microscopia.pdf](http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/2_microscopia.pdf) consultado el 24 de Agosto del 2015.
- Morales M. 2012. Uso de la fluorescencia y la microscopía confocal en la investigación científica. Servicio Interdepartamental de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid. SIdI-UAM.

- Moreira WL. 1993. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origen cárnico. Tesis. Universidad Complutense de Madrid.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfäüer MA. 2007. Microbiología médica. Elsevier Imprint. ISBN: 978-84-8174-927-4.
- Nahuelquín Y. 2008. Aplicación de una combinación de bacteriocinas bioencapsuladas, como higienizante de superficies de acero inoxidable. Tesis. Universidad Austral de Chile. Escuela de ingeniería en alimentos.
- Naz SA, Rasool SA. 2013. Isolation, production and characterization of bacteriocins produced by strains from indigenous environments. *Pakistan Journal of Botany* 45(1): 261-267.
- Nieto M. 2010. Fundamentos en la preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido. Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido. Laboratorios Institucionales. ECOSUR.
- Olmos D, González FJ. 2008-2009. Curso de Microscopía de Fuerza Atómica. Modos básicos de operación. Universidad Carlos III de Madrid.
- Ozgur S, Sergei M, Chanmin S, Calvin F, Olav S. 2007. An atomic force microscope tip designed to measure time-varying nanomechanical forces. *Nature Nanotechnology* 2:507-514.
- Parada JL, Caron CR, Medeiros ABP, Soccol CR. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 50 (3): 521-542.

- Pardio SV. 1994. Los probióticos y su futuro. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 46 (1): 6-10.
- Parvez S, Malik KA, Kang S.A, Kim HY. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. Journal Applied and Environmental Microbiology 100:1171-1185.
- Pasteur LJ, Joubert JF. 1877. Charbon et septicémie. Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la Société de Biologie Paris 85: 101-115.
- Pinilla AE, López MC, Viasus DF. 2008. Historia del protozoo *Entamoeba histolytica*. Revista Médica Chile, Santiago, 136(1): 118-124.
- Rajaram GP, Manivasagan B, Saravanakumar T, Saravanakumar A. 2010. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* isolated from marine environment. Advance Journal of Food Science and Technology (2): 138-144.
- Rastall RA. 2004. Bacteria in the gut; friends and foes and how to after the balance. Journal Nutritional 134: 2022S-2026S
- Reséndiz MC, Castrellón J. 2005. Microscopio de fuerza atómica. Encuentro de Investigación en Ingeniería Eléctrica. Zacatecas, Zac. Marzo 17-18.
- Rogers LA. 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. Journal of Bacteriology 16: 321-325.
- Rojas C, Vargas P. 2008. Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. Tecnología en Marcha. 21 (2): 9-16.

- Ríos J, Mercadillo P, Yuil E, Ríos M. 2012. Amebiasis cutánea: Conceptos actuales. Cutaneous amebiasis: Current concepts. Revista Médica del Hospital General de México 75(2):114-122
- Sáenz DR. 2013. *Entamoeba histolytica*: Inhibición del estadio trofozoíto y quiste por *Bifidobacterium longum* cultivado en sacarosa. Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Saito T. 2004. Selection of useful probiotic lactic acid bacteria from the *Lactobacillus acidophilus* group and their applications to functional foods. Animal Science Journal. 75: 1.13.
- Salminen SW, Morelli A, Marteau L, Brassart P, De vos D, Fondén W, Saxelin R, Collins M, Mongensen K, Birkeland G, Sandholm S. 1993. Demonstration of safety of probiotics -a review-. International Journal of Food Microbiology 44: 93-106.
- Santiago MG. 2010. Expresión de factores de virulencia de *Entamoeba histolytica* en un nuevo modelo experimental. Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Sargeant PG, Williams JE, Grene JD. 1978. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 72: 519-21.
- Savogado A, Ouattara CAT, Bassole IHN, Traore SA. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria- a minireview. African Journal of Biotechnology 9: 678-683.



- Sehgal D, Bhattacharya A, Bhattacharya S. 1996. Pathogenesis of infection by *Entamoeba histolytica*. *Journal of Bioscience* 21 (3): 423-432.
- Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*. 40 (3): 722-756.
- Talamás D, Talamás P, Fragoso RJ, Espinosa M, Chávez B, González A, Martínez A. 2015. Cell-matrix interactions of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. A comparative study by electron-atomic force- and confocal microscopy. *Experimental Cell Research*. 337 (2) Doi: 10.1016/j.yexcr.2015.07.030
- Tanyuksel M, Petri WA. 2003. Laboratory Diagnosis of Amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(4):713-729
- Tapia M. 2009. La nanotecnología en la investigación contra el cáncer. *Razón y Palabra* 68. Primera Revista Electrónica en América Latina Especializada en Comunicación [Online]. Disponible en: [www.razonypalabra.org.mx](http://www.razonypalabra.org.mx)
- Trejos J, Castaño J. 2009. Factores de virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*. *Infectology*. 13(2):100-110.
- Vamanu E, Vamanu A. 2010. The influence of prebiotics on bacteriocin synthesis using the strain *Lactobacillus paracasei* CMGB16. *African Journal Microbiology Research* 4(7): 534-537.
- Varo B. 2010. Caracterización parcial de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas aisladas de hortalizas. Tesis. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.

- Venema KAT, Haandrikman AJ, Leenhouts KJ, Kok J, Konings WN, Venema G. 1993. Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 1041-1048.
- Walsh A. 1986. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis. Stimulation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Revista Clinical Infectious Diseases* 8:228.
- Ximénez C, Cerritos R, Rojas L, Dolabella S, Morán P, Shibayama M. 2010. Human amebiasis: Breaking the paradigm? *International Journal Environmental Research and Public Health* 7:1105-1120.
- Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY. 2014. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in microbiology*. Review article 5:241. Doi: 10.3389/fmicb.2014.00241

### 13. RESUMEN BIOGRÁFICO

Fabiola Lizeth Cuellar Guevara

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Acentuación en Microbiología

Tesis: ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE BACTERIOCINAS SOBRE EL ENQUISTAMIENTO DE *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS Y CARACTERÍSTICAS NANOMECAÑICAS DE LA SUPERFICIE CELULAR AL MFA

Campo de Estudio: Microbiología

Datos Personales: Nacida en Monterrey, N.L. el 13 de Enero de 1990, hija de Norma E. Guevara Salazar y Mauro Cuellar Aguirre.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Biólogo en 2013.

Experiencia Profesional: Participante en proyectos de investigación como “Producción de la proteína HSP-70 del linfoma LGI 78 y su detección”. Además he trabajado empleando técnicas de PCR en detección de plantas transgénicas y en el mantenimiento de cultivo de protozoarios.

## 14. APÉNDICE TÉCNICO

### 14.1 ANEXO I

#### Análisis estadísticos

#### Análisis de Varianza (ANOVA)

##### FEP vs TROFOZOÍTO

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3994742063.492	6	665790343.915	1.841	<b>.108</b>
Within Groups	20253819444.444	56	361675347.222		
Total	24248561507.937	62			

##### FEP vs QUISTE

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	19238697916.667	9	2137633101.852	14.338	<b>.000</b>
Within Groups	11927083333.333	80	149088541.667		
Total	31165781250.000	89			

##### Log-bac-trofo

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13.660	10	1.366	49.016	<b>.000</b>
Within Groups	2.452	88	.028		
Total	16.113	98			

##### BACTERIOCINA vs QUISTE

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10341792708.333	15	689452847.222	15.579	<b>.000</b>
Within Groups	5664786666.667	128	44256145.833		
Total	16006579375.000	143			

## FEP vs TROFOZOÍTOS

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		FEPvsTROFO
N		63
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	117281.7460
	Std. Deviation	19776.39580
Most Extreme Differences	Absolute	.062
	Positive	.051
	Negative	-.062
Kolmogorov-Smirnov Z		<b>.495</b>
Asymp. Sig. (2-tailed)		.967

### Tukey HSD

Concentración	N	Subset for alpha = 0.05
		1
Bl 1 mg/mL	9	106805.5556
Lp 1 mg/mL	9	108333.3333
Lp 0.1 mg/mL	9	114166.6667
Lc 1 mg/mL	9	116527.7778
Lc 0.1 mg/mL	9	118611.1111
Bl 0.1 mg/mL	9	127638.8889
Ctrl	9	128888.8889
Sig.		.193

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

## FEP vs QUISTE

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		FEPvsQUISTE
N		90
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	32375.0000
	Std. Deviation	18713.02534
Most Extreme Differences	Absolute	.103
	Positive	.103
	Negative	-.081
Kolmogorov-Smirnov Z		<b>.979</b>
Asymp. Sig. (2-tailed)		.293

Tukey HSD

Concentración	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Lp 10 mg/mL	9	16111.1111				
Lp 1 mg/mL	9	16805.5556	16805.5556			
Bl 1 mg/mL	9	23194.4444	23194.4444	23194.4444		
Lp 0.1 mg/mL	9	24027.7778	24027.7778	24027.7778		
Bl 10 mg/mL	9	24722.2222	24722.2222	24722.2222		
Lc 10 mg/mL	9	33194.4444	33194.4444	33194.4444	33194.4444	
Lc 1 mg/mL	9		35000.0000	35000.0000	35000.0000	
Lc 0.1 mg/mL	9			37361.1111	37361.1111	
Bl 0.1 mg/mL	9				46527.7778	
Ctrl	9					66805.5556
Sig.		.104	.064	.305	.390	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

**BACTERIOCINA vs TROFOZOÍTO**

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		BACvsTROFO
N		126
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	38045.6349
	Std. Deviation	37427.76243
Most Extreme Differences	Absolute	.155
	Positive	.141
	Negative	-.155
Kolmogorov-Smirnov Z		1.736
Asymp. Sig. (2-tailed)		.005

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Logbactrofo
N		99
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	4.5353
	Std. Deviation	.40548
Most Extreme Differences	Absolute	.109
	Positive	.058
	Negative	-.109
Kolmogorov-Smirnov Z		1.088
Asymp. Sig. (2-tailed)		.188

### Tukey HSD

ConcentracionII	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
Sinergia (Lc+Lp) 0.5 mg/mL	9	3.8784						
Nisina 0.5 mg/mL	9	3.9577	3.9577					
Nisina 0.3 mg/mL	9		4.1985	4.1985				
Nisina 0.1 mg/mL	9			4.3687	4.3687			
Lc 0.1 mg/mL	9				4.5310	4.5310		
Lc 0.5 mg/mL	9					4.6569	4.6569	
Lp 0.3 mg/mL	9					4.6944	4.6944	
Control	9					4.7498	4.7498	4.7498
Lc 0.3 mg/mL	9						4.8872	4.8872
Lp 0.1 mg/mL	9							4.9632
Lp 0.5 mg/mL	9							5.0027
Sig.		.995	.095	.537	.607	.183	.132	.064

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

## BACTERIOCINA vs QUISTE

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

N		144
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	13785.4167
	Std. Deviation	10579.89232
Most Extreme Differences	Absolute	.096
	Positive	.091
	Negative	-.096
Kolmogorov-Smirnov Z		1.155
Asymp. Sig. (2-tailed)		.138

Tukey HSD

ConcentracionII	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Metronidazol 0.1 mg/mL	9	.0000			
Metronidazol 0.3 mg/mL	9	.0000			
Metronidazol 0.5 mg/mL	9	.0000			
Nisina 0.5 mg/mL	9	6805.5556	6805.5556		
Nisina 0.3 mg/mL	9	7083.3333	7083.3333		
Control	9		12083.3333	12083.3333	
Nisina 0.1 mg/mL	9		13472.2222	13472.2222	
Lp 0.3 mg/mL	9		14861.1111	14861.1111	
Sinergia (Lc+Lp) 0.1 mg/mL	9		15000.0000	15000.0000	
Lp 0.5 mg/mL	9			18611.1111	18611.1111
Sinergia (Lc+Lp) 0.5 mg/mL	9			19583.3333	19583.3333
Lc 0.1 mg/mL	9			20416.6667	20416.6667
Lc 0.5 mg/mL	9			20555.5556	20555.5556
Lp 0.1 mg/mL	9			22233.3333	22233.3333
Lc 0.3 mg/mL	9			22361.1111	22361.1111
Sinergia (Lc+Lp) 0.3 mg/mL	9				27500.0000
Sig.		.654	.399	.092	.264

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

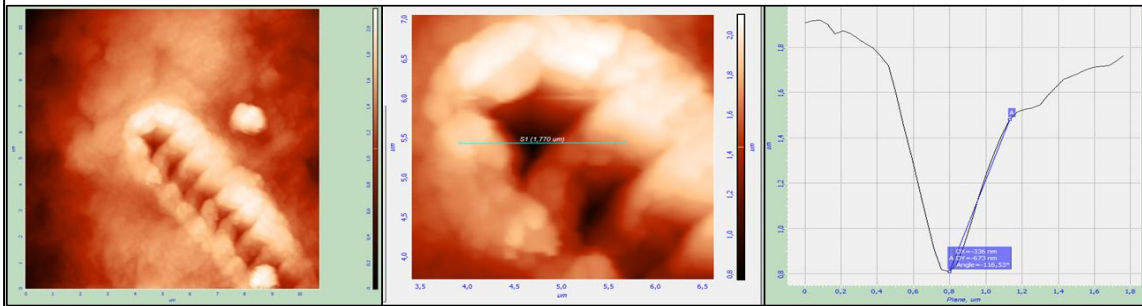
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.



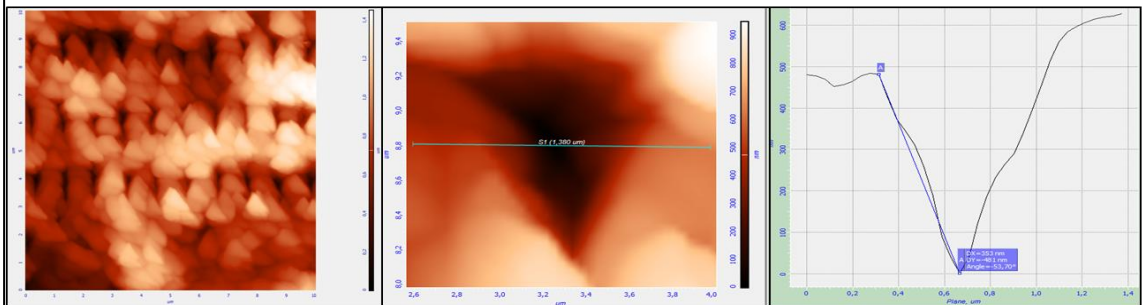
## 14.2 ANEXO II

### Imágenes de indentación

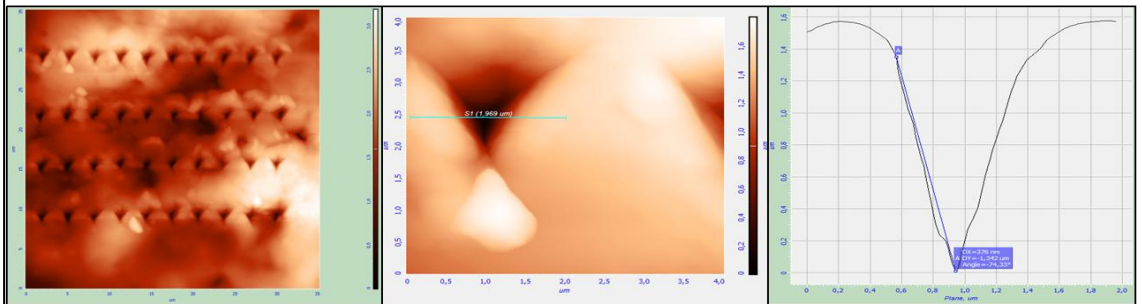
#### ESQ control



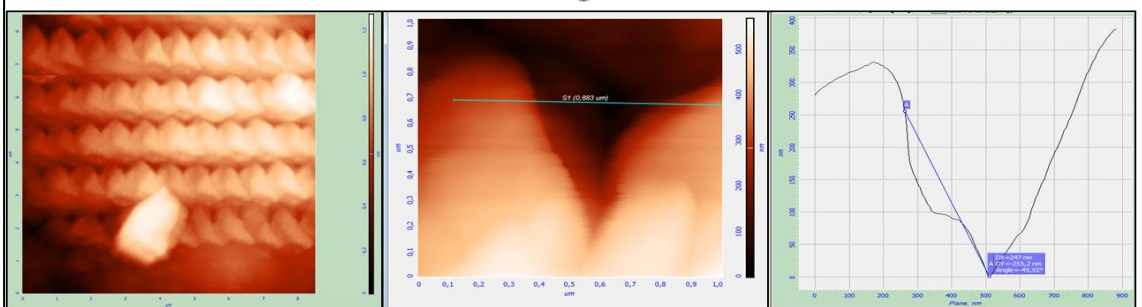
#### ESQ con FE Lp 10mg/mL



#### Trofozoíto control sin glutaraldehído



#### Trofozoíto control con glutaraldehído 0.05%



### 14.3 ANEXO III

**Tabla comparativa de profundidad de indentación y material desplazado**

<b>ESQ</b>	<b>TRATAMIENTO</b>	<b>PROFUNDIDAD</b>	<b>MATERIAL DESPLAZADO</b>
	Control	1.034 $\mu\text{m}$	249 nm
	Bacteriocina Lp 0.5 mg/mL	1.121 $\mu\text{m}$	375 nm
	FE Lp 10 mg/mL	501 nm	170 nm
	Sinergia 0.5 mg/mL	660 nm	297 nm

<b>TROFOZOÍTO</b>	<b>TRATAMIENTO</b>	<b>PROFUNDIDAD</b>	<b>MATERIAL DESPLAZADO</b>
	Control sin glutaraldehído	1.211 $\mu\text{m}$	352 nm
	Control con glutaraldehído 0.05%	300.2 nm	82.5 nm